

# *Requerimientos moleculares de acetogeninas annonáceas para diseñar derivados sintéticos selectivos en su acción insecticida*

**Tesista: Lic. José Ruiz Hidalgo**  
**Directora: Dra. Adriana Neske**

**2018**



**Universidad Nacional de Tucumán**  
**Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia**





UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
**FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos  
Dr. Manuel Javier Aybar  
Dra. Viviana Andrea Rapisarda  
Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano  
Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra  
Dra. María Antonieta Gordillo  
Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga  
Sr. Mario Rodríguez  
Sr. Joaquín Hernán Vargas  
Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez  
Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Inés Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
**FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



## DEPARTAMENTO DE POSGRADO

### AUTORIDADES:

#### DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

#### CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

#### Suplentes

Dra. María Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Véliz

#### REPRESENTANTE DE POSGRADO

#### ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
**FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO  
SUPERIOR DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

Acreditado y Categorizado acreditada A - Resolución CONEAU N° 708-13

**Directora:**

Dra. Aída Ben Altabef

**Vice Directora:**

Dra. Florencia Fagalde

**Comité Académico:**

Dra. Florencia Fagalde

Dra. Carola Schuff

Dra. Margarita Beatriz Villecco





UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
**FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA**  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

Requerimientos moleculares de acetogeninas anonáceas para diseñar derivados  
sintéticos selectivos en su acción insecticida

TESISTA:

Lic. José Ruiz Hidalgo


DIRECTORA:

Dra. Adriana Neske

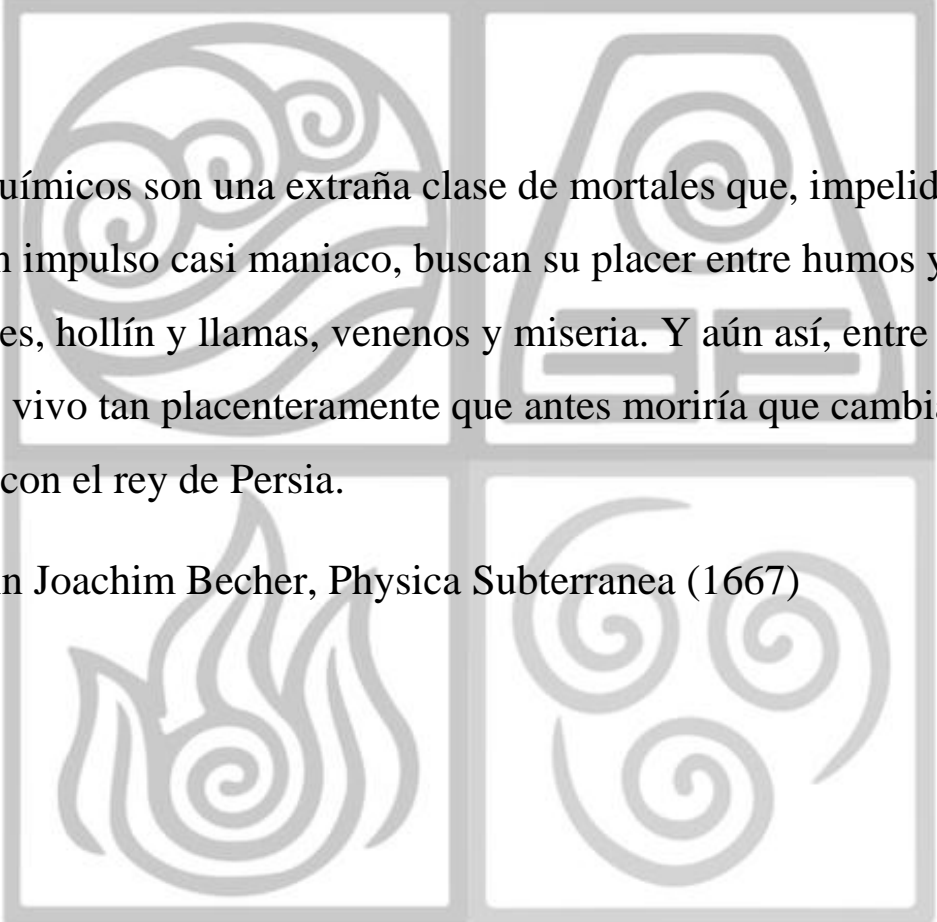
COMISION DE SUPERVISION:

Dra. Nancy Vera

Dr. Mario Fortuna



**Para la Humanidad...** El conocimiento no  
debe de negarse, ocultarse o mezquinarse,  
caso contrario, fallamos como  
personas de ciencias.



Los químicos son una extraña clase de mortales que, impelidos por un impulso casi maniaco, buscan su placer entre humos y vapores, hollín y llamas, venenos y miseria. Y aún así, entre estos males vivo tan placentemente que antes moriría que cambiar de lugar con el rey de Persia.

Johann Joachim Becher, *Physica Subterranea* (1667)

## Agradecimientos...

A la directora de este trabajo de tesis, Dra. Adriana Neske primeramente, por recibirme y apostar en mí para solicitar una beca doctoral y luego por la orientación, el seguimiento y confianza que me dió durante el tiempo que duró ésta investigación.

A la Dra. Nancy Vera y el Dr. Mario Fortuna, que conformaron la comisión de supervisión y con sus oportunas sugerencias pude encaminar desde otra óptica éste trabajo.

A la Dra. Alicia Bardón y a toda la catedra de Química Orgánica III, que me dieron un lugar para poder trabajar.

A la Dra. Lilian Di Toto Blessing y el Dr. Eduardo Parellada, que me guiaron y prestaron sus elementos de trabajo para poder realizar mis ensayos.

A la Dra. Karenina Marcinkevicius y la Dra. Constanza Luciardi, sin su ayuda desinteresada en enseñarme a usar elementos de laboratorios y equipos, no habría podido realizar las cosas a tiempo.

A mis amigos... actuales y ex compañeros de trabajo en el laboratorio de cromatografía, Dra. Andrea Sosa, Dra. Ana Rodriguez, Dr. Livio Corzo, Lic. Carolina Viola, Lic. Solana d'Hiriart, Lic. Mercedes Igarza, Lic. Juan Martinez, Lic. Ignacio Argañaraz, Lic. Ignacio Lopez Zampini, Lic. Pía Busnelli, Lic. Milena Jandar, Lic. Enrique Luján, Lic. Eliana Leal, Lic. Anahi Urbano, Antonela Romero, Maria Luz Rizzato; cada uno aportó diferentes cosas e hicieron de mis días en el "croma" el mejor lugar para trabajar; si leen esto... Sepan que el croma los extraña.

Al Dr. Miguel Gilabert y el Lic. Federico Arrighi que me brindaron sus conocimientos, ayuda y experiencia con la elucidación de mis compuestos en el LISA.

A la Lic. Melina Santillán que me acompañó días feriados o de fin de semana a comenzar o terminar ensayos.

A mi Familia que siempre estuvieron atentos a los resultados y avances de mi tesis.

A mi amigo y hermano por elección Esteban Robledo por ser quien me aconseja y alecciona sobre la vida siempre que lo necesito.

A Diego Robledo que fue la persona que diseñó las portadas y tapas, y cumplió con todos los pedidos que le hacía por más raros que parecían.

A mis amigos de siempre, Vika, Pollo, Fede, Diego, Matias.

A mi Padawan Mariana Romano, the dark side is strong in Us, Siths are best!.

Al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Y a todo aquel que, por falta de espacio, no llegué a nombrar.

A todos y cada uno... ¡¡GRACIAS!!.

## Abreviaturas

°C	Grados centígrados
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear protónica
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
ACG	Acetogeninas Annonáceas
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dicloro metano
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
cm	Centímetros
Col.	Colaboradores
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato Cúprico
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMAP	Dimetil aminopiridina
<i>ery</i>	<i>Erythro</i>
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
FAB-MS	Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos
FM	Fórmula molecular
FTIR	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier
g	Gramos
HPLC	Cromatografía líquida-líquida de alta resolución
H <sub>2</sub> O	Agua
IE-MS	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico
IR	Infrarrojo
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MOM	Metoximetilado
MOMCl	Cloruro de metoximetilo
m/z	Relación masa sobre carga
nm	Nanómetros
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Sodio
OAc	Acetilo
OH	Hidroxilo
PM	Peso molecular



ppm	Partes por millón
<i>t</i>	<i>Trans</i>
<i>th</i>	<i>Threo</i>
THF	Tetrahidrofurano
THP	Tetrahidropirano
tr'	Tiempo de retención
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
	Desplazamiento químico en RMN
μg	Microgramos
μm	Micrómetros

## **Hipótesis de trabajo**

La amplia acción insecticida de las acetogeninas anonáceas (ACG) naturales, puede ser optimizada si se preparan análogos estructurales semisintéticos, manteniendo el dominio  $\gamma$ -lactona, que cumple un importante rol en el mecanismo de toxicidad.

## **OBJETIVO GENERAL**

El presente Trabajo de Tesis Doctoral, tiene como objetivo aislar e identificar las ACG presentes en extractos alcohólicos de especies de la familia Annonaceae y modificarlas estructuralmente, por métodos químicos y/o enzimáticos. Realizar un estudio comparativo de la acción insecticida de las ACG naturales y sus análogos estructurales semisintéticos sobre *Spodoptera frugiperda* y/u otros modelos experimentales de plagas claves de cultivos de interés. Los resultados permitirán diseñar derivados sintéticos selectivos en su acción biológica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre la química de la familia Annonaceae y la actividad biológica de las ACG constituyentes.
2. Realizar la extracción selectiva del material vegetal seleccionado.
3. Realizar el análisis preliminar de los extractos obtenidos, por cromatografía en capa fina (CCF).
4. Separar y purificar las ACG presentes en los extractos metanólicos por cromatografía en columna (CC) y por cromatografía líquida-líquida de alta performance (HPLC).
5. Realizar modificaciones estructurales a las ACG naturales.
6. Purificar exhaustivamente por HPLC las ACG obtenidas por semisíntesis.
7. Realizar la elucidación estructural de las ACG naturales y las modificadas estructuralmente, mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de alta resolución mono y bidimensional y por Espectrometría de Masas.
8. Establecer las concentraciones óptimas y la formulación optimizada de las ACG naturales y las modificadas estructuralmente, para evaluar su acción insecticida sobre el lepidóptero, *Spodoptera frugiperda* y/u en otros modelos experimentales de plagas claves de cultivos de interés.
9. Realizar el estudio comparativo de la influencia de las ACG naturales y las modificadas estructuralmente en la actividad insecticida.
10. Conclusiones.

# ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Introducción	4
1.1. Familia Annonaceae	5
1.2. Hábitat y distribución	7
1.3. Características diagnósticas	7
1.4. Clasificación	8
1.5. Química de la familia Annonaceae	9
1.6. Usos	10
1.7. Las acetogeninas annonáceas	10
1.7.1. Clasificación de las acetogeninas annonáceas	11
1.7.1.1. Según el tipo de agrupamiento en la cadena alquílica.	12
1.7.1.2. Según el tipo de la lactona terminal	16
1.8. Técnicas generales de determinación estructural de ACG	18
1.8.1. Espectroscopia Ultravioleta-visible (UV)	18
1.8.2. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	18
1.8.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear: $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN	18
1.8.4. Espectrometría de Masas (EM)	25
ESTUDIO QUÍMICO DE <i>ANNONA SQUAMOSA</i> , <i>A. MONTANA</i> Y <i>A. MURICATA</i>	26
2. Estudio químico	27
2.1. Aislamiento	27
2.2. Separación y purificación de las ACG	28
2.3. Identificación de las ACG	29
2.3.1. Caracterización del anillo $\alpha$ -lactónico por IR y UV	29
2.3.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	30
2.3.2.1. Caracterización del anillo $\alpha$ -lactónico por $^1\text{H}$ -RMN	30

2.3.2.2. Caracterización del anillo $\alpha$ -lactónico por $^{13}\text{C}$ -RMN	31
2.3.2.3 Determinación de la naturaleza y estereoquímica del sistema THF	32
2.3.3. Determinación de la masa molecular por EM	32
2.4. <i>Annona squamosa</i> L.	34
2.4.1. Extracción y aislamiento de ACG naturales de <i>A. squamosa</i>	35
2.4.2. Acetogeninas annonáceas de <i>Annona squamosa</i>	38
2.5. <i>Annona montana</i> Macf.	43
2.5.1 Extracción y aislamiento de ACG naturales de <i>A. montana</i>	45
2.5.2. Acetogeninas annonáceas de <i>Annona montana</i>	47
2.6. <i>Annona muricata</i> L.	61
2.6.1. Extracción y aislamiento de ACG naturales de <i>A. muricata</i>	63
2.6.2. Acetogeninas annonáceas de <i>Annona muricata</i>	65
2.7. <i>Annona cherimolia</i> Mill.	67
2.7.1 ACG empleadas en los bioensayos que fueron previamente aisladas e identificadas de <i>Annona cherimolia</i> por nuestro grupo de trabajo	69
2.8. Modificación estructural de las ACG naturales	72
2.8.1. Obtención de derivados acetilados	72
2.8.1.1. Método por acetilación química	72
2.8.1.2. Método por acetilación enzimática	74
2.8.1.3. Identificación de las ACG acetiladas	75
2.8.1.3.1. ACG acetiladas químicamente	76
2.8.1.3.2. ACG acetiladas enzimáticamente	80
2.8.2. Metoximetilación de las ACG naturales	81
2.8.2.1. Identificación de los derivados metoximetilados (MOM)	81
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACETOGENINAS ANNONACEAS.	
METODOLOGÍA	84
3. Actividad biológica de las ACG	85
3.1. Acción Insecticida	86

3.2. Interés fitosanitario	87
3.2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i>	89
3.2.2. Tipos de daños	94
3.3. Búsqueda de insecticidas naturales. Importancia	96
3.4. Metodología de los bioensayos	97
3.4.1. Mantenimiento de la cría de <i>S. frugiperda</i> . Dieta artificial.	97
3.5. Diseño del Bioensayo en laboratorio	98
3.5.1. Formulaciones	98
3.6. Evaluación de la actividad antialimentaria, efectos nutricionales y toxicidad.	98
3.7. Bioensayo a semicampo	100
3.7.1. <i>Zea Mays</i>	101
3.7.1.1. “Maíz Leales 25” plus	103
3.7.1.2. Características destacables	103
3.8. Insecticida sintético lambda-cihalotrina empleado como control positivo	104
3.8.1. Ingrediente activo	104
3.8.2. Campo de actividad	105
3.8.3. Recomendaciones de uso	105
3.9. Formulaciones	106
3.10. Diseño del bioensayo a semicampo	106
3.11. Evaluación del efecto tóxico	107
<b>RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS DE LABORATORIO Y SEMICAMPO</b>	<b>108</b>
4. Bioensayos en laboratorio y a semicampo	109
4.1. Resultados de los bioensayos en laboratorio	109
4.1.1. Subextractos clorofórmicos	109
4.1.2. ACG mono-THF	112
4.1.3. ACG bis-THF no adyacentes	114
4.1.4. ACG bis-THF adyacentes	116



4.1.5. ACG mono-THF acetiladas químicamente	119
4.1.6. ACG Bis-THF adyacentes acetiladas químicamente	122
4.1.7. ACG Bis-THF adyacentes acetiladas enzimáticamente	125
4.1.8. ACG bis-THF metoximetiladas	127
4.1.9. Discusión de los bioensayos en laboratorio	129
4.2. Resultados de los bioensayos a semicampo	130
4.2.1. Evaluación de los efectos tóxicos	130
4.2.1.1. Sub extractos clorofórmicos	130
4.2.1.2. Acetogeninas annonáceas naturales y modificadas estructuralmente	133
4.3. Concentraciones óptimas y formulación	135
4.3.1. Discusión de los bioensayos en laboratorio	138
ESTUDIOS ESTRUCTURALES TEÓRICOS DE MOTRILIN Y SQUAMOCIN	139
5. Estudios Estructurales Teóricos de motrilin y squamocin	140
5.1. Espectros teóricos FT-IR y FT-Raman de ACG naturales	140
5.2. Técnicas de caracterización	141
5.3. Detalles computacionales	141
5.4. Conclusiones	145
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	146
6. Conclusiones	147
6.1 Proyecciones	148
BIBLIOGRAFÍA	149
7. Bibliografía	150
APÉNDICES	167
PRODUCCIÓN CIENTIFICA	262

## RESUMEN

La presente tesis doctoral aborda el estudio químico y biológico de acetogeninas annonáceas aisladas exclusivamente de especies de la familia Annonaceae. Se realizó también, el estudio teórico computacional para predecir las reactividades y comportamientos de algunas de ellas.

Se realizó el aislamiento, purificación e identificación de acetogeninas anonáceas naturales (ACG) presentes en 3 subextractos clorofórmicos: *Annona squamosa* (**SE1**), *A. montana* (**SE2**) y *A. muricata* (**SE3**). Se realizaron modificaciones estructurales por métodos químicos y enzimáticos a una serie de ACG naturales a fin de estudiar la relación estructura-acción insecticida de las ACG naturales y semisintéticas sobre *Spodoptera frugiperda* mediante 2 modelos experimentales: laboratorio y semicampo. Se realizaron también, mediante cálculos teóricos computacionales, estudios de estabilidad y reactividad de 2 ACG naturales.

La caracterización de las moléculas se llevó a cabo mediante espectroscopia Ultravioleta, Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y Espectrometría de Masas, en comparación con datos previamente reportados en la literatura. Se identificaron 18 ACG naturales: 1 nueva y 2 conocidas mono-tetrahidrofurano-tetrahidropiranos no adyacentes, 7 mono-tetrahidrofuranos (conocidas), 3 bis-tetrahidrofuranos no adyacentes (conocidas) y 5 bis-tetrahidrofuranos adyacentes (conocidas). De este conjunto, se seleccionaron 9 ACG mayoritarias y con potencial acción insecticida sobre *Spodoptera frugiperda*, para realizar las modificaciones estructurales. Por acetilación química se obtuvieron 3 mono-tetrahidrofuranos tri- y tetra-acetiladas y 5 bis-tetrahidrofuranos adyacentes tri-acetiladas. Por acetilación enzimática se obtuvieron 2 bis-tetrahidrofuranos adyacentes tri-acetiladas y por metoximetilación 3 bis-tetrahidrofuranos adyacentes tri-metoximetiladas.

Los resultados de la actividad insecticida en el laboratorio de los 3 subextractos clorofórmicos a 100 y 250  $\mu\text{g/g}$  indicaron que **SE1** a 250  $\mu\text{g/g}$  presenta la mayor toxicidad, provocando el 90% de mortalidad del lepidóptero en estadios tempranos, que es cuando esta plaga produce el mayor daño en los cultivos.

Las ACG naturales: motrilin, asimicin, rolliniastatin-2, squamocin y molvizarin (100  $\mu\text{g/g}$ ) resultaron ser las más tóxicas provocando significativa mortalidad (80, 85, 100, 100 y 100%, respectivamente).

Las ACG semisintéticas: asimicin tri-acetilada, laherradurin tri-acetilada e itrabin tri-acetilada a 100  $\mu\text{g/g}$  provocaron significativas alteraciones nutricionales y alta mortalidad larval en la etapa adulta del lepidóptero.

Los resultados de la actividad insecticida a semicampo mostraron que el subextracto **SE1** a 250 y 500  $\mu\text{g/g}$  provocaron la mayor toxicidad (45 y 60%) sobre *S. frugiperda* en estadios tempranos.

La ACG natural squamocin (100  $\mu\text{g/g}$ ) resultó más tóxica (55%) que sus análogas semisintéticas, squamocin tri-acetilada y squamocin tri-metoximetilada (35 y 25%, respectivamente) en las mismas condiciones experimentales.

Los resultados de los cálculos teóricos computacionales sugieren que las altas estabilidades de las ACG motrilin y squamocin, pueden atribuirse al anillo lactónico en sus estructuras. Las proximidades entre sus orbitales fronteras HOMO-LUMO revelan que motrilin es ligeramente más reactiva que squamocin y, por lo tanto, las posiciones de los grupos OH en la cadena lateral influyen en sus reactividades y comportamientos.

Estos resultados nos permitieron afirmar que:

- Las bis-THF ACG naturales son más tóxicas que las mono-THF ACG naturales frente a *S. frugiperda*.
- Las ACG naturales que tienen los grupos OH flanqueantes a los anillos bis-THF provocan la mayor toxicidad frente a *S. frugiperda*.
- La acción insecticida sobre *S. frugiperda* disminuye cuando los grupos OH se encuentran protegidos por la presencia de grupos acetilos (OAc) y aún más si están bloqueados con grupos metoximetilos (MOM).

Lo que nos llevó a concluir que:

“La presencia en las ACG de grupos OH flanqueantes a los anillos bis-THF es el requerimiento molecular indispensable para diseñar derivados sintéticos selectivos en su acción insecticida sobre *Spodoptera frugiperda*”

### 1. Introducción

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos y que se denominan metabolitos secundarios, también denominados productos secundarios o productos naturales.

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios que intervienen en mecanismos de defensa y adaptación al medio que los rodea, en el que están presentes patógenos y predadores. La habilidad de sintetizar estas sustancias, que pueden repeler o atraer a otros organismos, se ha desarrollado como una estrategia evolutiva en la lucha por la supervivencia. Es importante destacar que los metabolitos secundarios también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado este último de su uso en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica (Ávalos García y col., 2009).

La familia Annonaceae constituye un grupo importante con 2300 especies y 130 géneros. Muchas de estas especies han sido estudiadas por la aplicabilidad que tienen en medicina tradicional, así como en agricultura, cuya actividad ha sido atribuida a los metabolitos secundarios que producen las plantas durante su crecimiento y desarrollo.

Muchas investigaciones se centraron en los alcaloides, pero las annonáceas producen un amplio rango de compuestos no alcaloides pertenecientes a diferentes grupos fitoquímicos, entre ellos, las acetogeninas de annonáceas (ACG), que son conocidas por ser citotóxicas, insecticidas, antiparasitarias, fungicidas, herbicidas y sobre todo por su acción antitumoral, siendo capaces de inhibir el crecimiento de diversos tipos de líneas celulares tumorales.

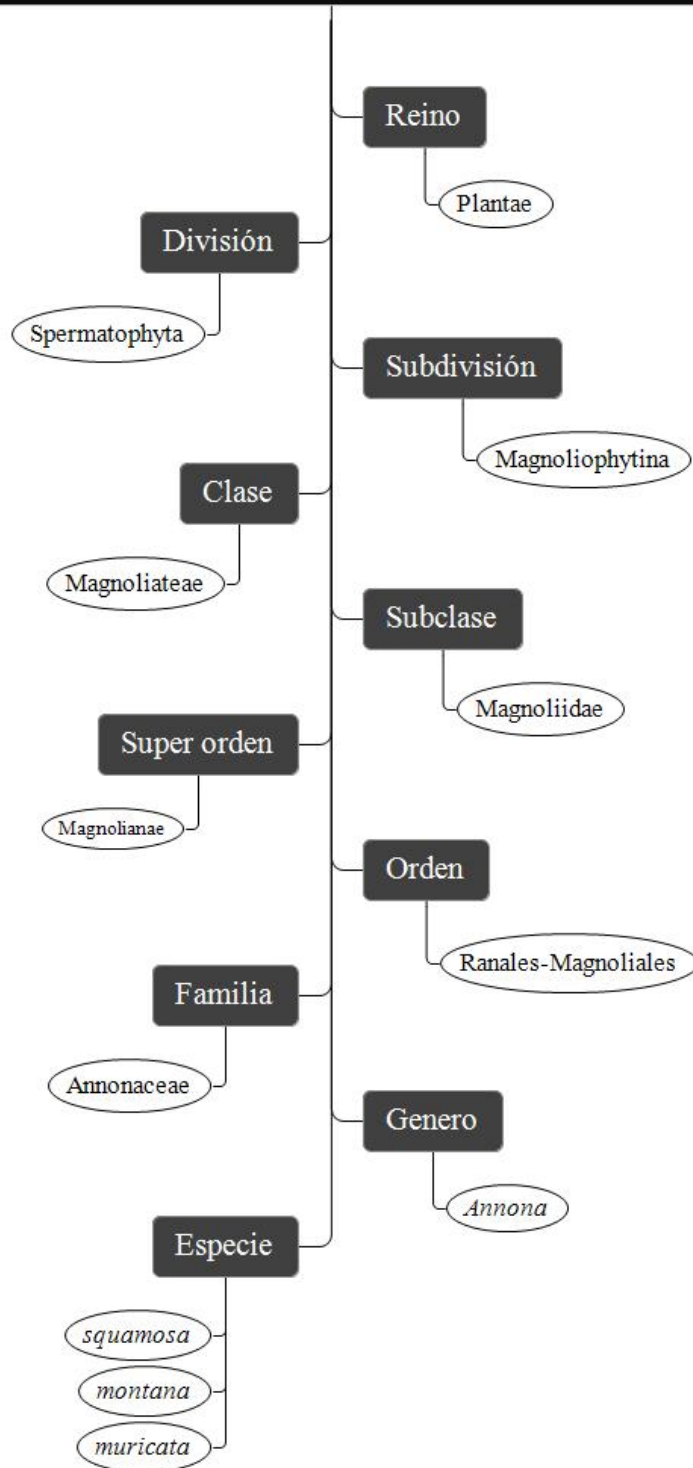
### 1.1. Familia Annonaceae

La familia Annonaceae es apreciada por poseer varias especies con frutas comestibles, el pawpaw (*Asimina triloba*), chirimoya (*Annona cherimolia*), guanábana (*Annona muricata*), anón (*Annona squamosa*), manzana flan (*Annona reticulata*) y plantas del género *Cananga* y *Rollinia* que también tienen frutos comestibles (Parodi, 1964). De algunas plantas se utilizan sus semillas de donde se extraen aceites comestibles. Algunos árboles de annonáceas son cultivados para la producción de alcohol. La fragancia de las flores de ylang-ylang (*Cananga odorata*) es muy importante en la industria de los perfumes. Muchos miembros de esta familia son usados en la medicina popular con distintos propósitos (Vásquez Chávez y col., 1996).



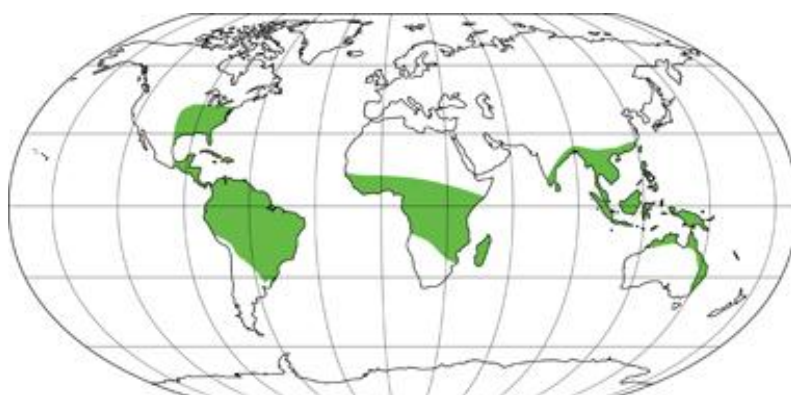
A continuación, se describe la posición sistemática dentro del reino de las plantas.

## Posición sistemática de la familia Annonaceae



## 1.2. Hábitat y distribución

Annonaceae es una extensa familia de árboles, arbustos o enredaderas aromáticas que aparecen en las regiones tropicales y subtropicales (Fig. 1.1.). En la zona tropical del Viejo Mundo se desarrollan en hábitat oportunistas y aparecen en las tierras bajas de densos follajes siempreverdes, pero en la zona de América tropical, crecen en zonas de planicie en el borde, donde comienza a crecer la hierba y cerca de los arbustos y árboles. Solamente un género, *Asimina*, se extiende en zonas templadas de los Grandes Lagos en América del Norte (Martinez-Crovetto y col., 1981).



**Figura 1.1.** Zona de distribución de la familia Annonaceae.

De acuerdo con Takhtajan y col., 1966, 51 géneros y casi 950 especies existen en Asia y Australia, 40 géneros y 450 especies en África y Madagascar y 38 géneros y 750 especies en el continente americano (Alali y col., 1999). De este modo tanto Asia como Australasia son el centro básico de distribución de las Annonáceas. Takhtajan reconoció que esta parte del mundo es la región nativa de esta familia (Alkofahi y col., 1989).

## 1.3. Características diagnósticas

Basándose en su hábitat y en su morfología, Annonaceae es una familia de plantas muy homogéneas (Fries y col., 1934). Las especies son árboles, arbustos o enredaderas, perennes o semi-perennes, con resinas en los canales y la médula de los tallos (Parodi y col., 1964). Las hojas son simples, generalmente enteras, alternas, pecioladas, típicamente dísticas, sin estípulas. La fragancia con frecuencia se siente antes que las flores estén totalmente desarrolladas (Fig. 1.2.), son espiraladas, actinomorfas, hermafroditas,

terminales, laterales o axilares, solitarias o en grupos de 2-3. Sépalos coralinos, en número de 2-4, persistentes o caedizos, libres o unidos formando un tubo 3-4 lobulado o dentado. Pétalos comúnmente 6, dispuestos en dos ciclos de perfloración valvada o imbricada, libres o unidos, raramente ausentes. Estambres normalmente numerosos, dispuestos en varias series sobre un toro; filamentos breves; anteras conniventes, bitecas; conectivo glanduloso en el ápice. Ovario súpero, formado por numerosos carpelos, íntimamente adosados entre sí, o bien separados, a veces definidos o aún reducidos a uno solo; estilo corto; estigma simple, capitado-oblongo o bilobulado; lóculos 1-pluriovulados. Frutos sincarpio carnoso o seco, sésil o estipitado, dehiscente, presentando a veces los carpelos libres entre sí (Fries y col., 1934) (Fig. 1.3.). Semillas con endospermo ruminado, algunas desarrollan un arilo a partir de un tercer tegumento.



**Figura 1.2.** Flores de la familia Annonaceae.



**Figura 1.3.** Frutos de la familia Annonaceae.

#### 1.4. Clasificación

Las annonáceas se caracterizan por poseer muchos rasgos extremadamente primitivos y arcaicos, por ejemplo, flores primitivas con un indefinido número de partes libres, con unos estambres dispuestos en forma espiralada, carpelos libres, etc. Darwin las llamó

“fósiles vivientes” que por una circunstancia favorable han podido escapar de la extinción y sobreviven en el presente. De acuerdo a Alkofahi y col., 1989, las annonáceas se incluirían dentro del orden Magnoliales (Annonales), con las familias más primitivas de angiospermas: Winteraceae, Magnoliaceae, Degeneriaceae, Himantandraceae, Eupomatiaceae, Canellaceae y Myristiaceae. Las Annonáceas están relacionadas con las Magnoliaceae, pero notablemente más avanzadas. El orden Magnoliales está unido a ordenes más avanzados: Laurales, Piperales, Aristolochiales, Ranunculales, Papaverales. Como fue visto más tarde, estas relaciones filogenéticas son en muchos casos vinculadas con la quimiotaxonomía. Se ha discutido el significado de las características del polen en la filogénesis de las annonáceas (Schlechtendal y col., 1935).

Sin embargo, definir bien el límite dentro del grupo de los géneros, es bastante dificultoso. Dos géneros provenientes del África, *Monodora* e *Isolona*, poseen ovarios sin carpelos (syncarpous) y fueron separadas como una subfamilia, Monodoroideae. Otra subfamilia, Annonideae, incluye otros géneros y se divide en diferentes tribus y subtribus (Záchia y col., 1994).

### 1.5. Química de la familia Annonaceae

De este grupo de plantas se han aislado principalmente, flavonoides (C-metilados y C-bencilados), monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos (kauranos y clerodanos), triterpenos y triterpenoides tetra y pentacíclicos, esteroides, saponinas, compuestos aromáticos, vitaminas, carotenos, compuestos nitrogenados no alcaloidales, bisbencilisoquinoleínas, bisbenciltetraisoquinoleínas, protoberberinas, aporfinas, tetraisoprotoberberinas, dehidroaporfinas, oxoaporfinas y fenantrenos. Muchas investigaciones se centraron en los alcaloides C-metilados, nitrofeniletano, bencilbenzoatos, estirilpironas y policétidos, así como, lignanos furofuránicos ((+)-epimembrina y (+)-epieudesmina). Las annonáceas producen un amplio rango de compuestos no-alcaloides pertenecientes a diferentes grupos fitoquímicos, entre ellos, las acetogeninas annonáceas. (Leboeuf y col., 1982)

## 1.6. Usos

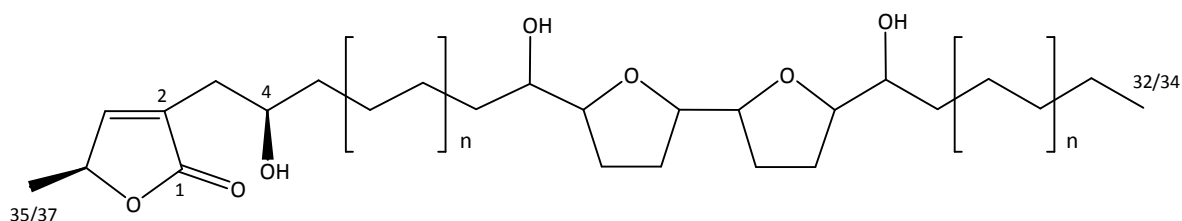
El principal interés económico de la familia se centra en los frutos comestibles de algunas especies como *Annona cherimolia*, cuyo fruto se conoce con el nombre de "chirimoya", *A. muricata* como "guanábana", *A. squamosa* como "annona". De menor interés, son el "mamón" o "annona colorada" (*A. reticulata*), la "chirimoya de Florida" (*Asimina triloba*) y el "biribá" o "anón amazónico" (*Rollinia mucosa*). Según la farmacopea del país. *Rollinia emarginata* Schltdl. (arachichú), es apreciada por sus frutos comestibles y utilizada en la elaboración de dulces. Popularmente, la decocción de sus hojas se usa para el dolor de garganta (gárgaras) y para calmar el dolor de muelas (buches). También, se puede mascar un puñado de hojas y tragar su jugo. El polvo de semillas de *R. mucosa* Baill., se utiliza contra la enterocolitis; el fruto se usa como antiescorbútico y la madera se usa en la construcción de embarcaciones y obras de interior. Algunos árboles de annonáceas son cultivados para la producción de alcohol. Las semillas de "guanábana" (*A. muricata*) y "chirimoya" (*A. cherimolia*) quedan como residuos del procesamiento industrial de los frutos, que alcanzan miles de toneladas por año, convirtiéndose en un factor de contaminación ambiental. Diversos estudios muestran que las annonáceas tienen efectos farmacológicos benéficos frente a algunos tipos de cáncer. Sin embargo, el uso de las semillas no está muy difundido. Restrepo y Vinazco (2010), mostraron que poseen un 22% de aceites, similar a las semillas de algodón (23%), de soja (18%) y más alto que en semillas de maíz (5%). Además, el análisis fisicoquímico de los extractos lipídicos, que incluyen la cromatografía de gases, reveló la presencia de ácidos grasos, como ácido oleico, linoleico y linolénico, estos dos últimos, esenciales en la dieta humana y en concentraciones equiparables con las de otras oleaginosas comerciales.

## 1.7. Acetogeninas annonáceas

Las acetogeninas annonáceas (ACG) constituyen una serie de productos naturales aislados exclusivamente de especies annonáceas que se encuentran distribuidas en las regiones tropicales y sub tropicales. Son metabolitos secundarios, con 35 o 37 átomos de carbono que derivan biogenéticamente del acetil CoA, formando parte de la biosíntesis de poliacetatos. Están constituidas por una larga cadena alquílica cuyo extremo terminal presenta habitualmente una  $\alpha$ -metil,  $\alpha$ -lactona (4 pentanolida) , -insaturada. En la cadena



hidrocarbonada unida a la lactona en posición 2, aparecen generalmente uno, dos, o más raramente, tres anillos tetrahidrofuranicos (THF) adyacentes o no, y pueden encontrarse además funciones oxigenadas principalmente grupos hidroxilos, acetilos o carbonilos, así como insaturaciones y/o ciclos epoxídicos. A la diversidad de grupos funcionales que pueden estar presentes, se agregan las distintas conformaciones que pueden adoptar los mismos en la molécula (Fig. 1.4.).



**Figura 1.4.** Estructura general de las acetogeninas más frecuentes en la naturaleza.

Se conocen aproximadamente 400 ACG (Bermejo y col., 2005). Las ACG son conocidas desde los años ochenta por su acción insecticida, acaricida, antihelmíntica y herbicida. En 1982, fue descrita la primera ACG, uvaricin, aislada a partir de las raíces de *Uvaria acuminata* (Annonaceae) (Jolad y col., 1982). Dos años después se describieron cuatro nuevos metabolitos secundarios que presentaban las mismas características estructurales.

En 1991, se descubrió que inhibían específicamente el complejo I mitocondrial y poco después se evidenció su capacidad para inhibir selectivamente el crecimiento de células tumorales en cultivo, incluidas aquellas resistentes a quimioterápicos actualmente utilizados (Oberlies y col., 1995, 1997; Tormo y col., 1999a). Estos estudios han permitido considerar a las ACG como uno de los grupos más promisorios entre los fármacos antitumorales.

#### 1.7.1. Clasificación de las acetogeninas annonáceas

Las ACG se clasifican según el tipo de agrupamiento en la cadena alquílica y en función del número y posición de los anillos THF y del tipo de lactona terminal (Bermejo y col., 2005).

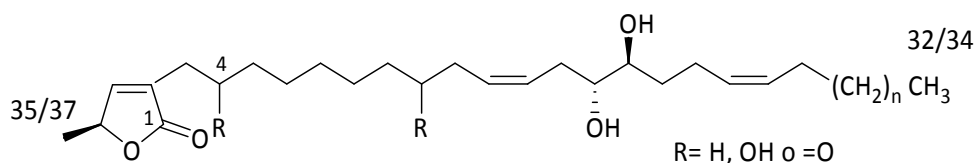
### 1.7.1.1. Según el tipo de agrupamiento en la cadena alquílica.

Según Zafra-Polo y col., 1998, éstas pueden clasificarse de acuerdo a sus características estructurales en seis grupos principales en función de los agrupamientos presentes en la cadena alquílica.

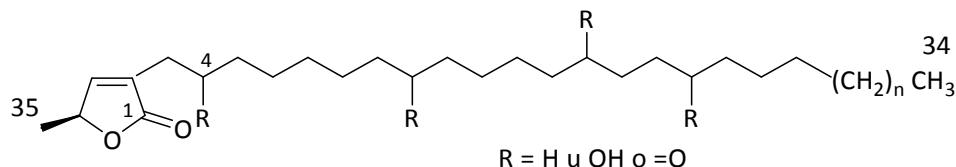
#### Grupo 1:

ACG lineales, poseen dobles enlaces o grupos hidroxilos a lo largo de la cadena alquílica. Pueden considerarse las precursoras biogénicas de las ACG epoxídicas y THF. Se diferencian entre sí por el grado de insaturación e hidroxilación de la cadena alquílica. Éste grupo se divide en 4 subgrupos (1A – 1D).

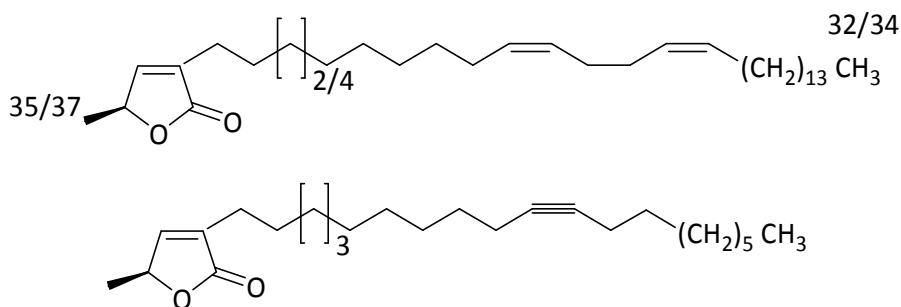
1A: ACG lineales olefínicas y dihidroxiladas “tipo giganin” (Fang y col., 1993). En estas ACG se ha establecido una geometría *cis* en los dobles enlaces y una configuración relativa *threo* en el diol vecinal.



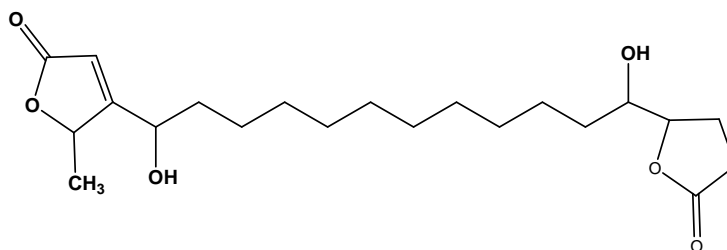
1B: ACG lineales hidroxiladas (o cetónicas) “tipo reticulatamol” (Zafra-Polo y col., 1998). Presentan una cadena hidrocarbonada saturada substituída por uno a más grupos hidroxilos no vecinales (o grupos cetónicos).



1C: ACG lineales olefínicas “tipo muridienin-1” (Gleye y col., 1996) y acetilénicas “tipo butyrolactone-2” (Chaves y col., 1997). Carecen de grupos hidroxilos en la cadena alquílica.



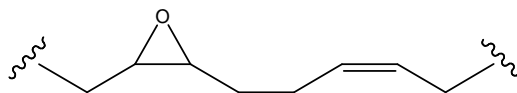
1D: ACG lineales bis lactónicas "tipo rollicosin" (Liaw y col 2003). Las ACG lineales bislactónicas son ACG que presentan uno o dos grupos hidroxilos caracterizados por la presencia de dos lactonas terminales a ambos lados de la cadena alifática y con la ausencia de anillos de THF o THP (tetrahidropirano).



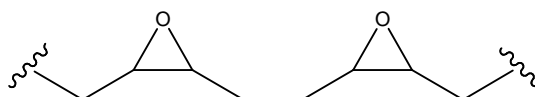
## Grupo 2:

ACG epoxídicas presentan uno o más anillos epoxídicos a lo largo de la cadena alquímica. Se pueden originar mediante la oxidación de las ACG lineales olefínicas, son, por lo tanto, metabolitos claves en la biosíntesis de ACG mono, bis, o tri-THF (Zeng y col., 1996). Éste grupo se las divide en 3 subgrupos (2A – 2C).

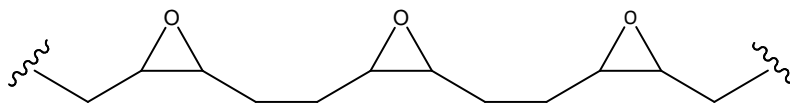
2A: con un anillo epoxídico (Gu y col., 1995).



2B: con dos anillos epoxídicos separados por dos metilenos.



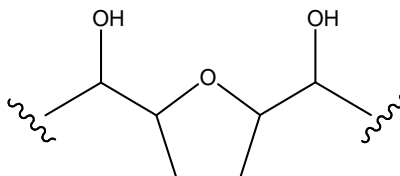
2C: con tres anillos epoxídicos separados por dos metilenos.



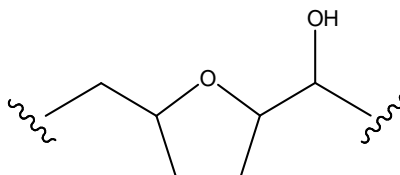
### Grupo 3:

Estas ACG poseen un único anillo THF en su estructura. Éste grupo se divide en 2 subgrupos (3A y 3B).

3A: el anillo THF está flanqueado por dos grupos hidroxilos, en  $\alpha$  y  $\beta$ . Son las ACG mono-THF más habituales.



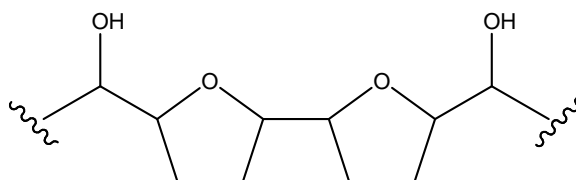
3B: ACG mono-THF y  $\beta$ -monohidroxiladas.



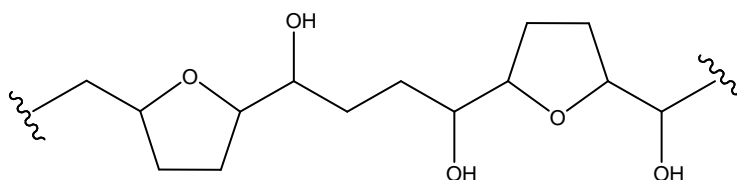
### Grupo 4:

ACG bis-THF: presentan dos anillos THF a lo largo de la cadena alquílica, que pueden ser adyacentes o encontrarse separados por cuatro o más carbonos. Éste grupo se divide en 4 subgrupos (4A – 4D).

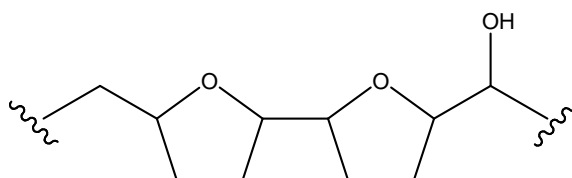
4A: Poseen los anillos THF adyacentes y flanqueados por dos grupos hidroxilos. Es el tipo de ACG bis-THF más habitual.



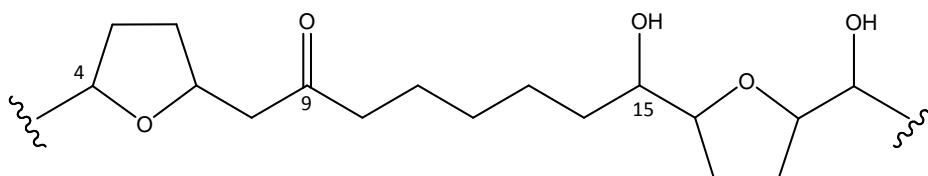
4B: Poseen anillos THF no adyacentes, separados en la mayor parte de los casos por cuatro carbonos.



4C: Poseen anillos THF adyacentes -monohidroxilados.

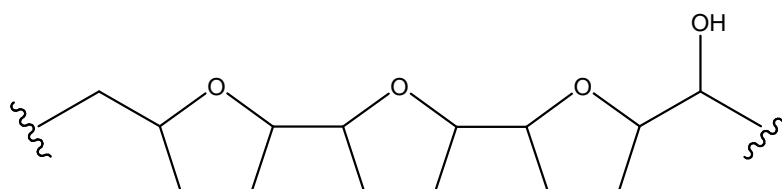


4D: Los anillos THF no son adyacentes y están separados por más de cuatro carbonos.



### Grupo 5:

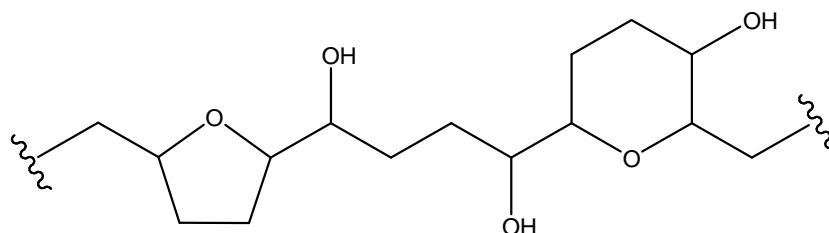
ACG tri-THF, en su estructura se destaca la presencia de tres anillos THF adyacentes.



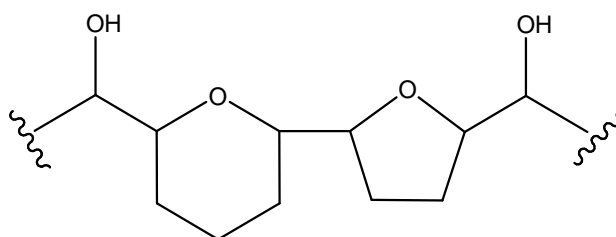
### Grupo 6:

ACG bis-THF-THP y mono-THP. Presentan dos anillos en su cadena alquílica, uno THF y otro tetrahidropiránico (THP), que pueden ser adyacentes o no adyacentes separados por cuatro carbonos; también se han aislado compuestos con un sistema mono-THP. Éste grupo se divide en 3 subgrupos (6A – 6C).

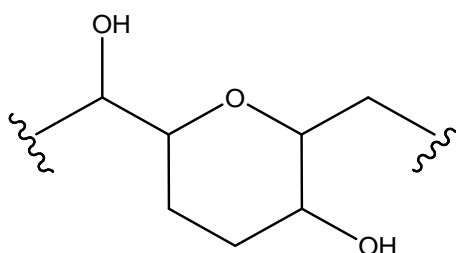
6A: Los anillos THF y THP son no adyacentes y están separados por cuatro carbonos.



6B: Los anillos THF y THP son adyacentes.



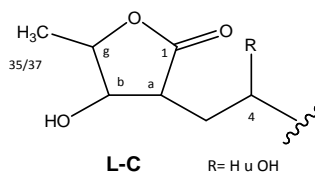
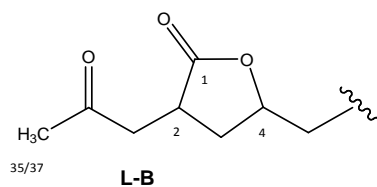
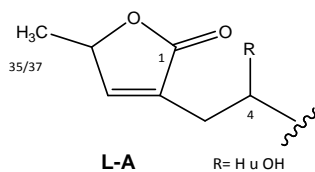
6C: Son ACG que poseen un solo anillo THP.



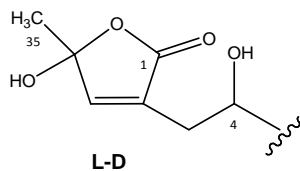
#### 1.7.1.2. Según el tipo de la lactona terminal

La mayoría de las ACG poseen una  $\alpha$ -metil  $\gamma$ -lactona,  $\alpha$ -insaturada (L- A), pero existen también otras que tienen una  $\gamma$ -lactona saturada unida en posición 2 a un grupo 2-

propanona (L-B), son las denominadas iso-ACG o una  $\alpha$ -metil  $\gamma$ -lactona saturada  $\alpha$ -hidroxilada (L-C).



Recientemente, se aislaron ACG que están formadas por otro tipo de lactona, una  $\alpha$ -hidroxi-  $\alpha$ -metilactona-  $\beta$ ,  $\gamma$ -insaturada (L-D) (Jiang y col., 1997).



## 1.8. Técnicas generales de determinación estructural de ACG

### 1.8.1. Espectroscopia Ultravioleta-visible (UV)

El espectro de absorción de radiación UV permite distinguir entre una lactona saturada que absorbe por debajo de  $\lambda_{\text{máx}}$  210 nm y una  $\alpha$ -lactona,  $\alpha$ -insaturada que absorbe a mayores. Los espectros fueron realizados con un equipo Shimadzu UV-Vis160A. Los valores obtenidos se compararon con los previamente informados por Rupprecht y col. (1990).

### 1.8.2. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

La espectroscopia de infrarrojo permite diferenciar entre una  $\alpha$ -lactona saturada tipo L-B1, L-B2, L-C y L-E donde se observa una banda de absorción debido al carbonilo hacia  $\lambda_{\text{máx}}$  1770-1765  $\text{cm}^{-1}$  y una  $\alpha$ -lactona- $\gamma,\delta$ -insaturada tipo L-A y L-D cuya banda de carbonilo se sitúa entre  $\lambda_{\text{máx}}$  1760-1755  $\text{cm}^{-1}$ , excepto en la lactona tipo L-F cuya banda de absorción se observa a  $\lambda_{\text{máx}}$  1760  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros se realizaron con un equipo Shimadzu IR-408.

### 1.8.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear: $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN

Las ACG de annonáceas se caracterizan por la presencia de un anillo lactónico terminal que, como ya se ha descrito, puede ser de cuatro tipos. Los datos espectrales de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  permiten determinar con exactitud el tipo de anillo lactónico.

**Tipo L-A:** lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas

-Sin OH en C-4: el protón olefínico en posición S, H-33 o H-35, resuena como doblete a  $\delta_{\text{H}}$  7.0-7.20 ppm; este doblete está deformado debido al acoplamiento alílico con los protones del C-3 que resuenan como triplete a  $\delta_{\text{H}}$  2.2 ppm. Los protones del grupo  $\alpha$ -metil, C-35 o C-37, resuenan a  $\delta_{\text{H}}$  1.4 ppm en forma de doblete y el  $\text{H}_x$  resuena a  $\delta_{\text{H}}$  5.0 ppm como cuarteto desdoblado.

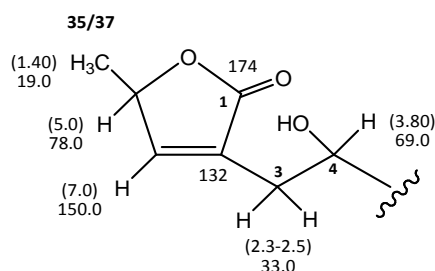


En  $^{13}\text{C}$ -RMN se observa una señal de carbonilo (C-1) a  $\delta$  174.0 ppm, los carbonos olefínicos a  $\delta$  134.0 y a  $\delta$  149.0 ppm; la señal del metino (C-34 o C-36) a  $\delta$  78.0 ppm y una señal de  $\alpha$ -metilo a  $\delta$  19.0 ppm. Los C-3 y C-4 resuenan alrededor de  $\delta$  25.0 y  $\delta$  27.0 ppm.

-Con OH en C-4: se observa un sistema ABX muy característico debido a los protones equivalentes en C-3 que resuenan a  $\delta$  2.5 y  $\delta$  2.3 ppm y al protón en posición 4 que resuena a  $\delta$  3.8 ppm.

En  $^{13}\text{C}$ -RMN se observa que los tres carbonos de la cadena hidrocarbonada más próximos a la lactona resuenan a  $\delta$  33.0 ppm (C-3),  $\delta$  69.0 ppm (C-4) y  $\delta$  37.0 ppm (C-5), respectivamente y los carbonos olefínicos a  $\delta$  131.0 y a  $\delta$  152.0.

### Valores de desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ para las lactonas tipo L-A

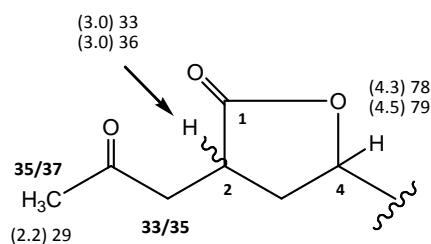


#### Tipo L-B<sub>1</sub>: iso-acetogeninas

Se caracterizan por presentar un singlete a  $\delta$  2.2 correspondiente al metilo terminal en posición 35/37. Las señales correspondientes a los protones H-2, H-3, H-4 y H-33/35 aparecen desdobladas en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN por tratarse de mezclas de diastereoisómeros. Además los protones H-3 y H-33/35 de cada diastereoisómero no son equivalentes, por lo que en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN podemos distinguir los protones H-3 *cis*,*r* y *s*, H-3 *trans*,*r* y *s*, H-33/35 *cis*,*r* y *s* y H-33/35 *trans*,*r* y *s*.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observan las señales correspondientes a los carbonos C-2 ( $\delta$  33.0-36.0) y C-4 ( $\delta$  78.0-79.0). Las señales de los carbonos de la lactona también aparecen desdobladas (Cavé y col., 1997).

### Valores de desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ para las lactonas tipo L-B<sub>1</sub>

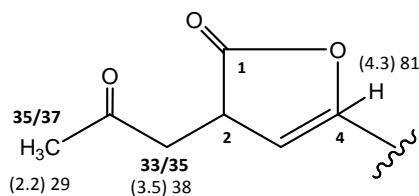


#### Tipo L-B<sub>2</sub>: -acetoni- $\alpha$ -lactona, $\beta$ -insaturada

Se observa en el espectro una señal de doblete a  $\delta_{\text{H}}$  7.4 ppm debido al protón olefínico (H-3) y a  $\delta_{\text{H}}$  5.0 ppm una señal correspondiente al protón H-4 ya que no existe la mezcla de isómeros. Los protones H-33 son equivalentes y resuenan como singlete a  $\delta_{\text{H}}$  3.5 ppm (Wang y col., 2002).

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observa que la señal del carbono C-4 se deslaza a valores de  $\delta_{\text{C}}$  81.0 ppm, así como el C-33 hacia  $\delta_{\text{C}}$  38.0 ppm.

### Valores de desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ para las lactonas tipo L-B<sub>2</sub>

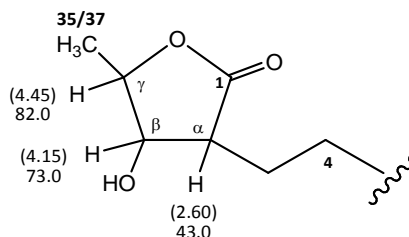


#### Tipo L-C: $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -lactona saturada

Son las ACG que poseen una lactona saturada e hidroxilada en el anillo lactónico, presentan en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN un sistema ABX correspondiente a los H  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de la lactona.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observa que los carbonos correspondientes resuenan hacia 43.0, 73.0 y 83.0 ppm respectivamente (Cavé y col., 1997).

### Valores de desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ para las lactonas tipo L-C

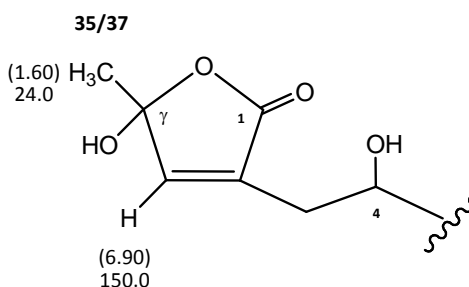


#### Tipo L-D: $\alpha$ -hidroxi- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -lactonas, S-insaturadas

En estas moléculas se destacan las señales correspondientes al protón olefínico hacia  $\delta_{\text{H}}$  6.9 ppm y las de los protones del  $\alpha$ -metil a  $\delta_{\text{H}}$  1.6 ppm como singletes.

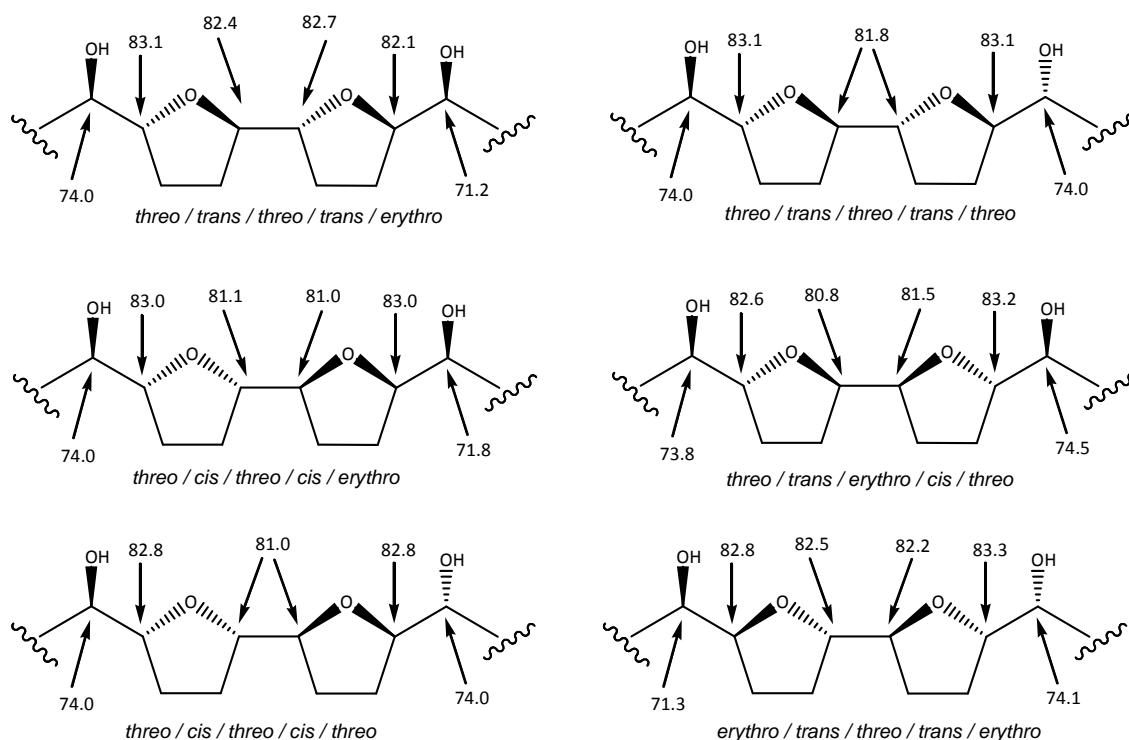
En  $^{13}\text{C}$ -RMN la resonancia del grupo metilo en la posición  $\alpha$  se desplaza a  $\delta_{\text{C}}$  24.0 ppm y los dos carbonos olefínicos resuenan a  $\delta_{\text{C}}$  150.0 ppm y  $\delta_{\text{C}}$  132.0 ppm (Cavé y col., 1997).

### Valores de desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ para las lactonas tipo L-D

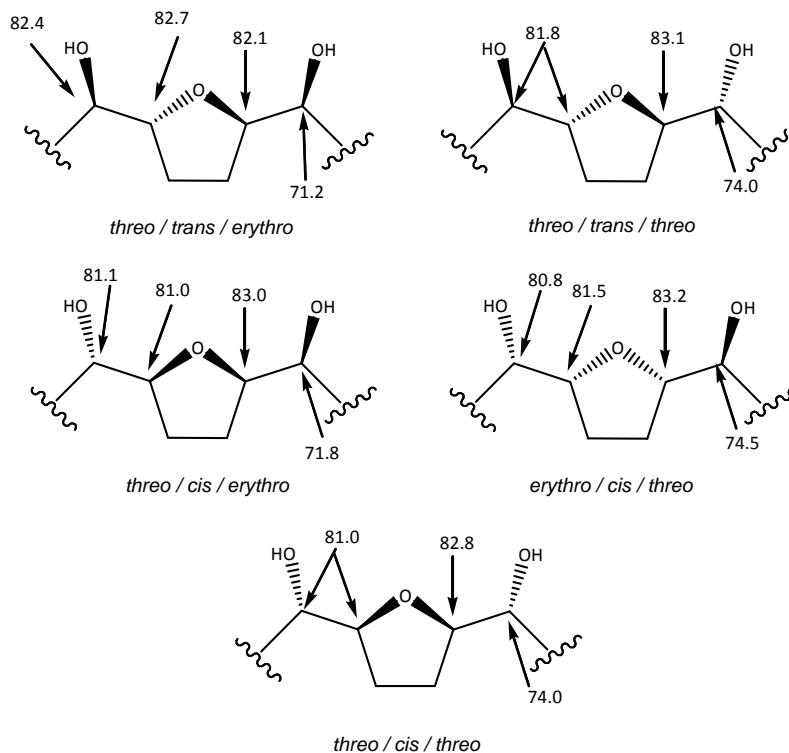


#### Determinación de la naturaleza y estereoquímica del sistema THF

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  proporcionan una gran información acerca del sistema THF que presentan las ACG. Los grupos carbinoles de los THF resuenan habitualmente entre  $\delta_{\text{C}}$  79.0 y 83.0 ppm, de tal manera que según el número de señales que aparecen en esta zona, podemos deducir el número de anillos THF y la estereoquímica relativa de la molécula. Los sistemas más simétricos producen menos señales debido a que aumenta el número de carbonos magnéticamente equivalentes. El análisis de esta zona del espectro, permite la determinación de la estereoquímica relativa (Hoye y col., 1987, 1988). Cuando se encuentran dos sustituyentes con la misma configuración relativa en la cadena carbonada se les asigna configuración “*erythro*”. Mientras que, cuando la configuración relativa es opuesta se les asigna configuración “*threo*”. Se ejemplifica a continuación.



Las diferencias a nivel de los desplazamientos químicos de los espectros de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de las ACG, han permitido hasta el momento distinguir seis tipos de ACG bis-THF adyacentes, seis tipos de ACG bis-THF no adyacentes y cinco tipos de ACG mono-THF en función de su configuración relativa a nivel de los anillos THF



**Identificación de los grupos funcionales**

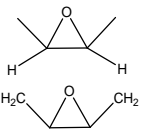
Las ACG presentan en su cadena alquílica grupos funcionales tales como hidroxilo, carbonilo, dioles vecinales, insaturaciones y epóxidos. La presencia de estos grupos se pone de manifiesto mediante el análisis de los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Los carbonos hidroxilados situados en la cadena hidrocarbonada resuenan entre  $\delta_{\text{C}}$  67 y  $\delta_{\text{C}}$  74 y los protones entre  $\delta_{\text{H}}$  3.4 y  $\delta_{\text{H}}$  3.8. Si estos carbinos están aislados, es decir, no están bajo la influencia de otros hidroxilos o de grupos carbonilos, resuenan a  $\delta_{\text{C}}$  71 y su protón correspondiente a  $\delta_{\text{H}}$  3.5. Los carbinos en posición 4 de las ACG resuenan a  $\delta_{\text{C}}$  69 y su protón a  $\delta_{\text{H}}$  3.8 (señal confundida en el multiplete donde aparecen los protones de los THF).

La presencia de anillos epoxídicos viene indicada por un multiplete sobre  $\delta_{\text{H}}$  2.9 en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, correlacionado en HMQC con señales de carbono entre  $\delta_{\text{C}}$  56 - 58.

La existencia de un sistema olefínico sobre la cadena alquílica se evidencia en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN por un multiplete sobre  $\delta_{\text{H}}$  5.3; que se correlaciona en HSQC con dos resonancias pertenecientes a carbonos  $sp^2$  entre  $\delta_{\text{C}}$  128 y  $\delta_{\text{C}}$  130. Para comprobar si la cadena hidrocarbonada de una ACG es insaturada se puede preparar el correspondiente derivado dihidrogenado mediante hidrogenación catalítica con C/Pd.

La existencia de grupos funcionales se identifica gracias a sus característicos desplazamientos químicos en espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN, así como por las bandas de absorción en el espectro de IR, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Datos de IR y RMN de grupos funcionales de ACG			
Grupos funcionales	<sup>1</sup> H-RMN (ppm)	<sup>13</sup> C-RMN (ppm)	IR (cm <sup>-1</sup> )
<b>Hidroxilo</b> -CH-OH -CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -	3,5 1,4	71,4 37	3400 - 3600
<b>Diol</b> -CHOH-CHOH- -CH <sub>2</sub> -CHOH-CHOH-CH <sub>2</sub> -	3,4 1,30 - 1,50	77 33 - 35	3400 - 3600
<b>Cetona</b> -C=O- -CH <sub>2</sub> -(C=O)-CH <sub>2</sub> -	2,4	211 42,8	1700 - 1710
<b>Doble enlace</b> -HC=CH- -CH <sub>2</sub> -HC=CH-CH <sub>2</sub> -	5,3 <i>cis</i> : (J = 6 -12 Hz) <i>trans</i> : (J = 12 - 18 Hz) <i>cis</i> : 2,20 y 2,05 <i>trans</i> : 2,00	128 - 130  <i>cis</i> : 27 <i>trans</i> : 32	
<b>Epóxido</b> 	2,99 1,55	56 - 58 26 -28	

#### 1.8.4. Espectrometría de Masas (EM)

La determinación de la masa molecular se logra mediante el uso de la EM con ionización química (CIMS). Asimismo, la ionización por impacto electrónico (EIMS) a 70 eV con el uso de un analizador de trampa de iones, permite determinar el ion quasimolecular  $[MH]^+$  del cual puede deducirse fácilmente la masa molecular. El fenómeno que origina este ión se denomina auto ionización química (Pannell y col., 1989) y la bibliografía sugiere que aquellas sustancias que producen muchos iones alquilos se fragmentan y son capaces de transferir protones a moléculas neutras. A menudo, se describe el uso de técnicas blandas de ionización para la determinación del peso molecular de las ACG, como en el caso de la técnica FAB (Bombardeo de átomos rápidos). El material a analizar se mezcla con un ambiente químico no volátil de protección llamado matriz, que contiene Li ó Na. Es una técnica de ionización relativamente suave y produce iones  $[MLi]^+$  ó  $[MNa]^+$  de los que puede deducirse el peso molecular. En la determinación estructural de las ACG juega un rol muy importante la espectrometría de masas por impacto electrónico (IE) y el bombardeo rápido de átomos (FAB).

La técnica de IE nos proporciona más información sobre la localización de los sistemas THF, epóxidos, dobles enlaces y otros grupos funcionales existentes a lo largo de la cadena alquílica, así como para confirmar el tipo de lactona terminal presente en la ACG.

El peso molecular exacto se conoce empleando espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS). Experimentalmente, se observan tantas pérdidas de  $H_2O$  ( $[MH]^+ - 18$ ) como oxhidrilos existan en la molécula.

## 2. Estudio químico

El estudio químico de las especies *Annona squamosa*, *A. montana* y *A. muricata* plantea el aislamiento, separación e identificación de ACG naturales presentes en los subextractos clorofórmicos de dichas especies y la modificación estructural de algunas de ellas.

Entre las numerosas acetogeninas presentes en especies de la familia Annonaceae pusimos especial énfasis en el aislamiento y purificación de annonacin, una ACG aislada de semillas de *Annona muricata*. Es un compuesto que presenta actividad relacionada con la inhibición del transporte de electrones de la Cadena Respiratoria Mitocondrial y ha sido atribuida como la causa del trastorno parkinsoniano en Guadalupe (Antillas Francesas). Se ha reportado que annonacin causa la muerte celular y tauopatía en cultivos de mesencéfalo y la neurodegeneración de los ganglios basales y el tronco cerebral después de la administración intravenosa a ratas.

Nuestro grupo de trabajo, colabora con el aporte de annonacin para el estudio de los procesos de agregación amiloide de las proteínas alfa-sinucleína y tau, en su presencia, como una contribución desde el área Química a la red multidisciplinaria que investiga la influencia de las ACG en procesos neurodegenerativos. Los resultados permitirán dilucidar las bases moleculares del Parkinsonismo atípico y la implicancia de factores ambientales en esta patología.

En este trabajo también estudiamos ACG que fueron aisladas previamente por otros investigadores del grupo a partir de semillas de *A. cherimolia*, tales como, molvizarin, asimicin, laherradurin e itrabin (Barrachina y col., 2004).

### 2.1. Aislamiento

El material vegetal recolectado es secado al aire, triturado y sometido a procesos de extracción por maceración a temperatura ambiente.



El material triturado (tallos y hojas o semillas) de cada especie fue colocado en un matraz erlenmeyer. Este material se cubrió con metanol y se dejó en reposo por unos días con agitación ocasional. Luego, el extracto obtenido se filtró y se evaporó el solvente en evaporador rotatorio. Se repitió la extracción 3 veces, obteniéndose un extracto polar de cada una de las especies. Los extractos se partitionaron en una mezcla de cloroformo-agua ( $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$ ) (1:1), obteniéndose los respectivos subextractos clorofórmicos.

## 2.2. Separación y purificación de las ACG

Los subextractos clorofórmicos se fraccionaron por cromatografía en columna de mesada (CC) de Silica gel (70-140 Mesh) como fase estacionaria y cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) con cantidades crecientes de acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ) (0-100%) y luego metanol ( $\text{MeOH}$ ), como fase móvil. Se separaron fracciones de diferentes polaridades que luego fueron sometidas a nuevos procesos cromatográficos para su purificación.

La evolución de cada CC fue monitoreada por cromatografía en capa fina (CCF). Para ello se utilizaron cromatofolios Merck F254 (con indicador fluorescente a 254 nm). Se utilizó primero luz UV como revelador físico, para observar las sustancias capaces de absorber dicha radiación. Luego se realizó un revelado químico con Reactivo de Kedde (Solución A: solución metanólica del ácido 3,5-dinitrobenzoico, solución B: solución metanólica de KOH) para visualizar las ACG con  $\alpha$ -lactona  $\gamma$ , $\delta$ -insaturadas (tipo L-A) que producen una coloración fucsia característica.

Las fracciones eluidas que revelaron positivas con el Reactivo de Kedde, fueron procesadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Esta técnica permite mayor resolución que la CC en la separación de mezclas y obtención de compuestos puros. La técnica de HPLC, puede ser llevada a cabo ya sea en fase normal o en fase reversa. En fase normal se emplea como adsorbente sílica gel y como fase móvil mezclas de solventes de baja polaridad (generalmente hexano/acetato de etilo). En fase reversa, la fase estacionaria es no polar (octilsilano C8 u octadecilsilano C18) y la fase móvil es polar, usándose con frecuencia mezclas  $\text{MeOH/H}_2\text{O}$  o  $\text{CH}_3\text{CN/H}_2\text{O}$ .

Para HPLC fue usado un cromatógrafo Gilson con detector de índice de refracción (Instituto de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT),

empleando una columna semipreparativa Phenomenex Luna C18 (5  $\mu$ m, 10 mm i.d. x 250 mm) como fase estacionaria y mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O en distintas proporciones como fase móvil.

### 2.3. Identificación de las ACG

Una vez purificadas las ACG naturales, se realizó la identificación mediante técnicas espectroscópicas, tales como Infrarrojo (IR), Ultravioleta-Visible (UV), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (EM).

En el caso de nuevos productos naturales, si es necesario, se realizan derivatizaciones (acetilaciones, metilaciones, hidrogenaciones, etc.) y se los somete a estudios espectroscópicos para confirmar la estructura. Cuando es posible, se obtienen derivados cristalinos adecuados para análisis por difracción de Rayos-X.

#### 2.3.1. Caracterización del anillo $\alpha$ -lactónico por IR y UV

La espectroscopia IR permite obtener información sobre los grupos funcionales presentes en la molécula analizada, siendo una técnica complementaria en la elucidación estructural. La absorción en el IR permite distinguir entre una  $\alpha$ -lactona saturada tipo L-B y L-C, donde el carbonilo absorbe entre 1750-1770  $\text{cm}^{-1}$  y una  $\alpha$ -lactona insaturada tipo L-A y L-D, que presenta una intensa absorción debida al carbonilo conjugado a 1730-1745  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros se realizaron con un equipo Shimadzu IR-408.

La espectroscopia UV es una técnica que brinda información sobre los grupos cromóforos presentes en la molécula de interés. Para que una molécula absorba radiación ultravioleta a longitudes de onda mayores a 200 nm (UV cercano o de cuarzo), debe presentar por lo menos uno de los siguientes grupos:

- ) Dos o más dobles enlaces conjugados
- ) Un anillo aromático
- ) Un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado
- ) Un doble enlace adyacente a un átomo con un par de electrones no compartidos (O, N, S, etc.)

) El espectro ultravioleta-visible de una sustancia es sencillo y consta de una o unas pocas bandas anchas de absorción. Sin embargo, la posición exacta de máximos de absorción puede brindar información sobre el grupo cromóforo presente en la molécula.

)

El espectro UV permite distinguir entre una lactona saturada que absorbe por debajo de 210 nm y una  $\alpha,\beta$ -lactona-insaturada que absorbe a mayores. Los espectros fueron realizados con un equipo Shimadzu UV-Vis160A. Los valores obtenidos se compararon con los previamente informados por Rupprecht y col. (1990).

### 2.3.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Esta técnica es la más importante en la elucidación estructural de compuestos orgánicos ya que brinda información sobre la conectividad de los átomos en la molécula y sobre la disposición espacial de los átomos.

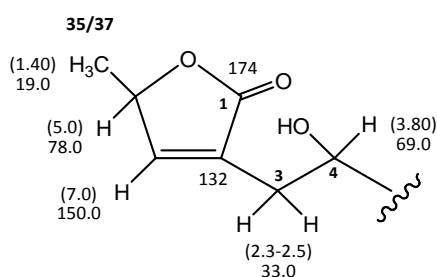
Existen técnicas de RMN unidimensionales y bidimensionales. Dentro de las técnicas unidimensionales encontramos la resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$ -RMN) y de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -RMN). Dentro de las bidimensionales encontramos las técnicas COSY (Correlated Spectroscopy, Espectroscopia correlacionada), HSQC (Heteronuclear Simple Quantum Coherence, Coherencia Cuántica Simple Heteronuclear), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence, Coherencia Cuántica Heteronuclear múltiple) y NOESY (Nuclear Overhauser Enhanced Spectroscopy, Efecto Nuclear Overhauser).

#### 2.3.2.1. Caracterización del anillo $\alpha$ -lactónico por $^1\text{H}$ -RMN

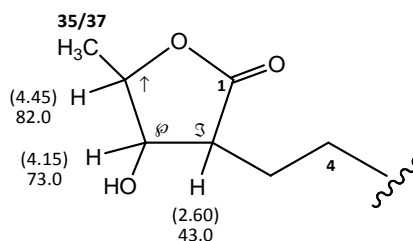
Todas las ACG de anonáceas se caracterizan por la presencia de un anillo lactónico terminal que puede ser de cuatro tipos. El protón olefínico de las lactonas del tipo L-A resuena como doblete por el acoplamiento con el protón en posición hacia 7.0 ó 7.20. La señal se encuentra deformada por el acoplamiento alílico con los protones del carbono 3. El protón resuena hacia 5.0 ppm como un cuarteto desdoblado al acoplarse con los protones del metilo terminal y con el protón en . El metilo en resuena a 1.4 ppm.

Si se trata de un compuesto hidroxilado en posición 4 se observa un sistema ABX debido a los protones no equivalentes en posición 3 y al protón en posición 4. Los protones no equivalentes resuenan a 2.5 y 2.3 ppm y el protón en posición 4 resuena a 3.8 ppm. Este sistema ABX no puede observarse en ACG sin hidroxilo en posición 4. En este caso se observa un triplete a 2.2 ppm correspondiente a los protones equivalentes del C3. Las lactonas del tipo L-C es decir las  $\alpha$ -hidroxi-acetogeninas presentan en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN un sistema ABX correspondiente a los H  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de la lactona que resuenan a 2.6, 4.15 y 4.45 ppm respectivamente.

### 2.3.2.2. Caracterización del anillo $\alpha$ -lactónico por $^{13}\text{C}$ -RMN



Lactona tipo L-A



Lactona tipo L-C

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se observa a 174 ppm la señal correspondiente al carbonilo de la lactona. Los carbonos olefínicos resuenan a 132 ppm (cuaternario) y 150 ppm (terciario). También en la lactona pueden observarse las señales del metino a 78 ppm y a 19 ppm la señal del metilo en . Si se tratase de una ACG hidroxilada en posición 4, los 3 carbonos más cercanos a la lactona, es decir, C5, C4 y C3, resuenan a 33, 69 y 37 ppm respectivamente. En las lactonas del tipo L-C, es decir en las  $\alpha$ -hidroxi-acetogeninas se observa que los carbonos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  resuenan a 43, 73 y 83 ppm, respectivamente.

### 2.3.2.3 Determinación de la naturaleza y estereoquímica del sistema THF

En un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN los grupos carbinoles resuenan habitualmente entre 79 y 83 ppm. El número de señales que aparecen en esta zona depende de la simetría del sistema THF. Los sistemas más simétricos producen menos señales puesto que aumenta el número de carbonos magnéticamente equivalentes. El análisis de esta zona del espectro permite la determinación de la estereoquímica relativa. Cuando se encuentran dos grupos idénticos del mismo lado de la cadena carbonada de la molécula se asigna la configuración “*erythro*”. Cuando estos grupos se encuentran en lados opuestos de la cadena se asigna como “*threo*”.

Los espectros de RMN de este trabajo fueron tomados con un equipo Bruker 200 MHz para  $^1\text{H}$  y 50 MHz para  $^{13}\text{C}$  (Laboratorio de Investigación y Servicios Analíticos LISA, CONICET-UNT) y de 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  (Instituto de Química Rosario IQUIR, CONICET-).

### 2.3.3. Determinación de la masa molecular por EM

El uso de la espectrometría de masas en la elucidación estructural de las ACG permite determinar, en adición al peso molecular, la posición de los grupos funcionales en la cadena. Por ejemplo, el uso combinado de las técnicas de RMN y MS permite diferenciar claramente entre motrilin y squamocin que difieren sólo en la posición de un oxhidrilo en la porción hidrofóbica terminal.

En los casos de ACG que difieren solamente en el número de carbonos resulta muy útil la determinación del peso molecular. Tal es el caso de laherradurin e itrabin que presentan espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  muy similares. Ambas comparten la misma configuración en el sistema THF, pero laherradurin cuenta con 2 carbonos más en el “dominio espaciador” (la zona comprendida entre el dominio lactónico y la zona de los THF).

Los fragmentos característicos suelen corresponder a la ruptura entre los anillos THF o entre un THF y un grupo hidroxilo adyacente.

La determinación de la masa molecular se logra mediante el uso de la espectrometría de masas con ionización química (CIMS). Asimismo, la ionización por impacto electrónico a 70 eV con el uso de una trampa de iones permite observar el ión quasimolecular  $[MH]^+$ . A menudo la bibliografía describe el uso de técnicas blandas de ionización para la determinación del peso molecular de las ACG. Tal es el caso de la técnica FAB (Bombardeo de átomos rápidos). El material a analizar se mezcla con un ambiente químico no volátil de protección llamado matriz que contiene Li ó Na. Es una técnica de ionización relativamente suave y produce moléculas protonadas  $[MLi]^+$  ó  $[MNa]^+$  de las que puede deducirse el peso molecular. La naturaleza de sus productos de ionización coloca esta técnica cerca del electrospray.

Los espectros de masas de baja resolución fueron obtenidos en un espectrómetro Thermo Polaris Q (Laboratorio de Investigación y Servicios Analíticos, LISA, CONICET-UNT). Este espectrómetro de masas utiliza como detector una trampa de iones y no un detector de cuadrupolo como la mayoría de los espectrómetros. El detector de trampa de iones es capaz de producir en algunas situaciones, iones quasimoleculares cuando se está utilizando IE. Éste es un fenómeno observado frecuentemente y está descrito en bibliografía como auto-ionización química en detectores de trampa de iones (Eichelberger y col., 1987). La autoionización química es un fenómeno intermolecular de transferencia de masas que produce el ion quasimolecular  $[M+H]^+$ , lo que se observa en analizadores de masas de almacenamiento de iones cuando aumenta la presión de la muestra o es sometida a confinamientos prolongados. El proceso es particularmente favorecido con moléculas alifáticas que contienen heteroátomos. La formación del  $[M+H]^+$  es importante cuando los fragmentos alquílicos, cuyas bases conjugadas tienen afinidad protónica baja, están presentes en abundancia (Pannell y col., 1989).

## 2.4. *Annona squamosa* L.

Se la conoce vulgarmente como “chirimoya crespa”. Es un arbusto o árbol pequeño de 3-5 metros de alto, de madera blanca, poco resistente. Sus hojas son lanceoladas de 8-12 cm de largo por 4-6 cm de ancho (Fig. 2.1.). Posee flores solitarias, opuestas a las hojas; conteniendo 6 pétalos: 3 externos verdes-grises y 3 internos rudimentarios (Fig. 2.2.). Su fruto es un sincarpo de 7-10 cm de diámetro formado por la agrupación de carpelos que se unen y en la completa madurez se separan dejando ver una pulpa blanca. Contiene una semilla dura en cada carpelo, de color negro, envuelta por una pulpa blanca, jugosa y de muy agradable sabor.

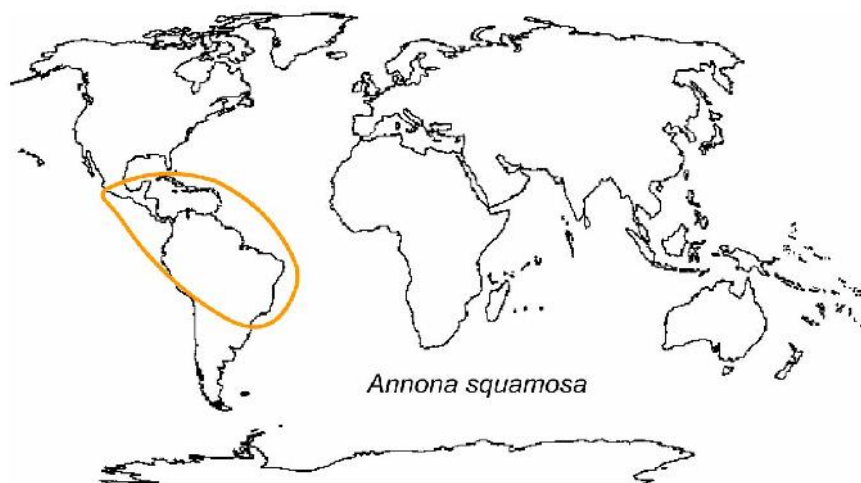


**Figura 2.1.** Ejemplar herborizado de *A. squamosa*.



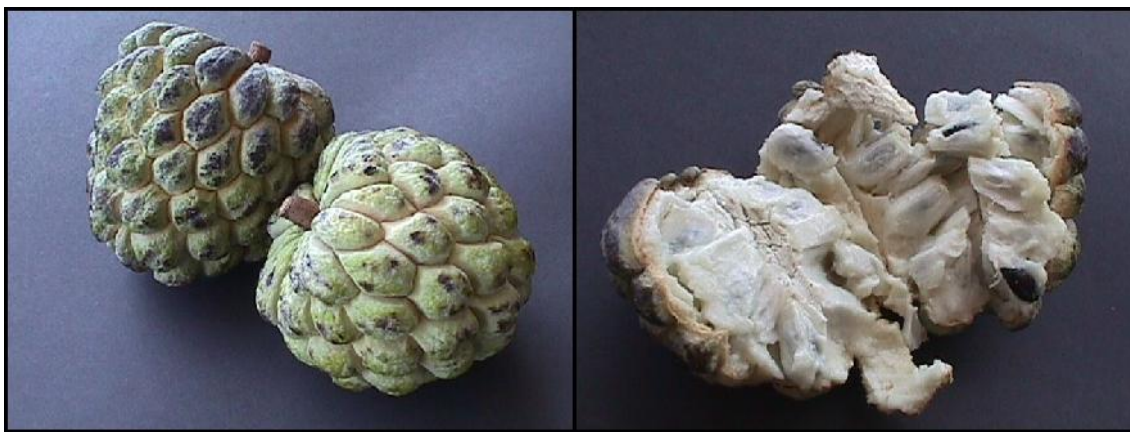
**Figura 2.2.** Flores de *A. squamosa*.

**Ecología y distribución.** La chirimoya crespa crece en lugares secos hasta una altitud de 1000 m. Es una planta de origen americano y se la encuentra en las zonas tropicales y subtropicales de norte a Sudamérica (Fig. 2.3.). Se desarrolla preferentemente en lugares donde las precipitaciones están entre 500 y 1000 mm anuales.



**Figura 2.3.** Zona de distribución de la *A. squamosa*.

**Usos.** Los frutos se los come en estado fresco (Fig. 2.4.). Es una de las más dulces y exquisitas de todas las "chirimoyas". La pulpa sirve para preparar helados; también como ingrediente mezclado con el yogur.



**Figura 2.4.** Frutos de *A. squamosa*.

#### **2.4.1. Extracción y aislamiento de ACG naturales de *Annona squamosa***

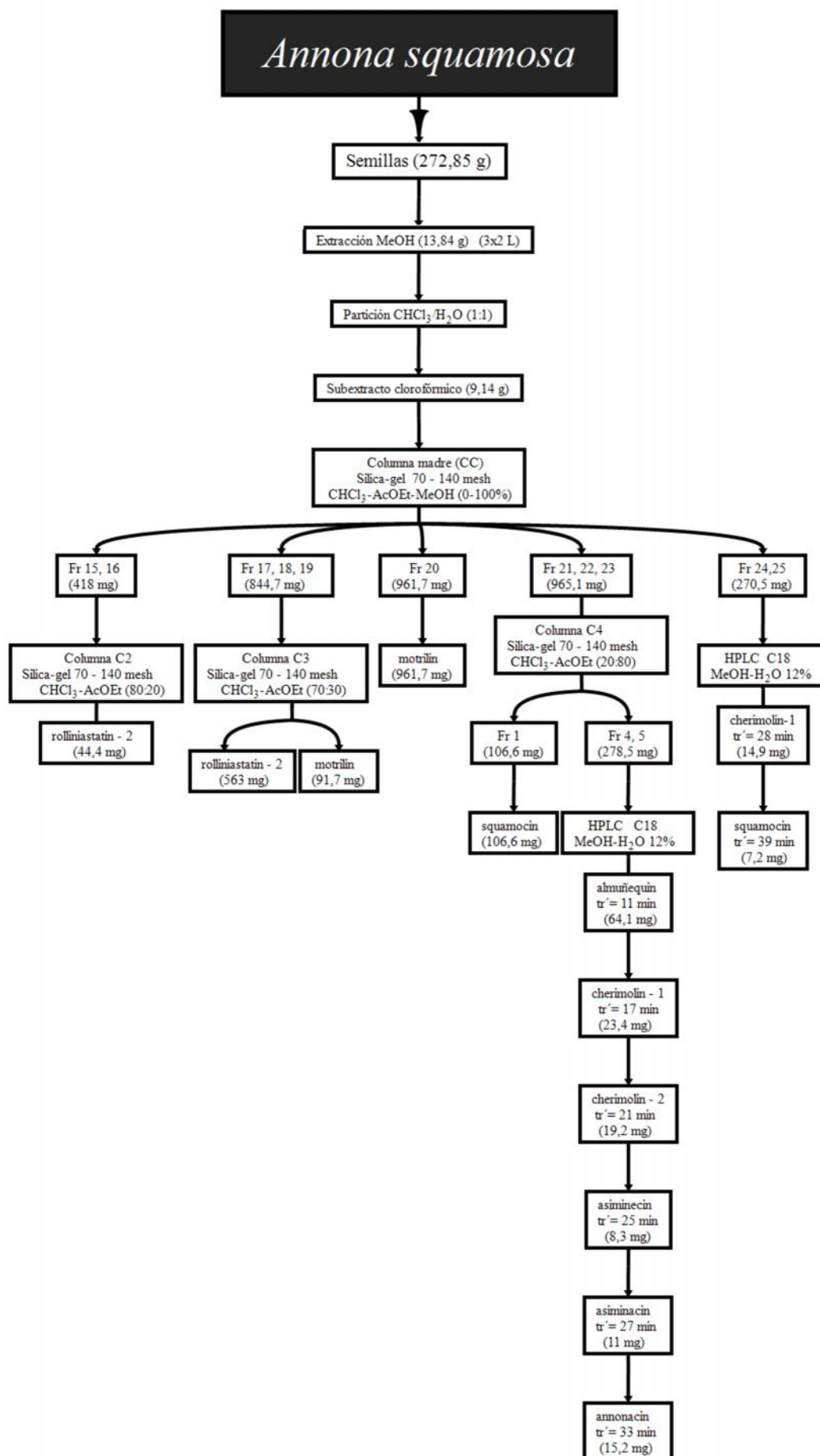
A partir de 272,85 g de semillas secas y molidas de frutos de *A. squamosa* recolectadas en Pernambuco, Brasil (2011), se realizó una extracción con metanol (3x2 L). Luego de



evaporar el solvente con evaporador rotatorio se obtuvieron 13,84 g de extracto metanólico. Se realizó la partición del extracto con una mezcla de  $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$  (1:1), obteniéndose 9,14 g de subextracto clorofórmico, el que fue procesado por cromatografía en columna de Silica-gel 70-140 Mesh. Empleando mezclas  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt-MeOH}$  (0-100%) como eluyente. Se obtuvieron 28 fracciones de acuerdo a sus perfiles cromatográficos en CCF.

- J Las fracciones **15** y **16** (418 mg) fueron reunidas y procesadas por CC de Silica-gel 70-140 Mesh, empleando mezclas  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  (80:20). Como resultado del proceso se obtuvieron 44,4 mg de rolliniastatin-2.
- J Las fracciones **17**, **18** y **19** (844,7 mg) fueron reunidas y procesadas por CC de Silica-gel 70-140 Mesh, empleando mezclas  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  (70:30). Como resultado del proceso se obtuvieron 563 mg de rolliniastatin-2 y 91,7 mg de motrilin.
- J La fracción **20** (961,7 mg) dio un sólo compuesto puro que se identificó como motrilin.
- J Las fracciones **21**, **22** y **23** (965,1 mg) fueron reunidas y procesadas por CC de Silica-gel 70-140 Mesh, empleando mezclas  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  (20:80). Como resultado del proceso se obtuvieron 6 fracciones. La fracción **2** (205,2 mg) se identificó como squamocin (205,2 mg). Las fracciones **4** y **5** (278,5 mg) fueron reunidas y procesadas por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm x 250 mm,  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (12%), flujo 2 mL/min; obteniéndose 64,1 mg de almuñequin ( $\text{tr}'=11$  min); 23,4 mg de cherimolin-1 ( $\text{tr}'=17$  min); 19,2 mg de cherimolin-2 ( $\text{tr}'=21$  min); 8,3 mg de asiminecin ( $\text{tr}'=25$  min); 11 mg de asiminacin ( $\text{tr}'=27$  min) y 15,2 mg de annonacin ( $\text{tr}'=33$  min).
- J Las fracciones **24** y **25** (270,5 mg) fueron reunidas y procesadas por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm x 250 mm,  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (12%), flujo 2 mL/min, obteniéndose 14,9 mg de cherimolin-1 ( $\text{tr}'=28$  min) y 7,2 mg de squamocin ( $\text{tr}'=39$  min).

A continuación, se describe de manera esquemática la metodología utilizada para el aislamiento y purificación de acetogeninas annonáceas.

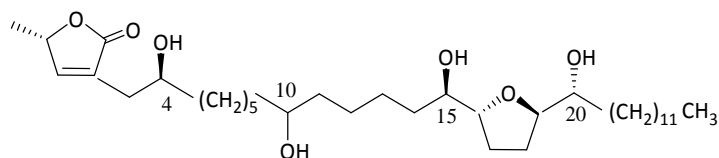


### 2.4.2. Acetogeninas anonáceas de *Annona squamosa*

El estudio químico de las semillas de *A. squamosa* condujo al aislamiento de nueve ACG conocidas, annonacin (McCloud y col., 1987), almuñequin (Fujimoto y col., 1990), cherimolin-1 (Hui y col., 1989 Cortes y col., 1991b), cherimolin-2 (Gu y col., 1993), rolliniastatin-2 (Pettit y col., 1989), motrilin (Cortes y col., 1991a), squamocin (Fujimoto y col., 1988), asiminecin, asiminacin (Zhao y col., 1994), las que fueron identificadas por sus características espectroscópicas en comparación con los datos de literatura previamente reportados.

A continuación, se listan los datos de bibliografía correspondientes a cada uno de los compuestos identificados (PM, fórmula molecular, configuración relativa de sus sistemas THF, estructura, UV, IR,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN y MS).

#### annonacin



PM: 596

FM:  $\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_7$

Configuración: *th/t/th*

UV: (  $\text{máx}$  MeOH) 218 nm

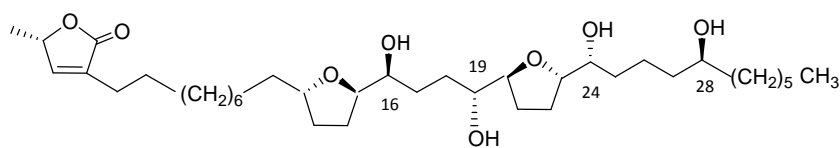
IR: ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3440,1750

$^1\text{H}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,60 (H-10); 3,81 (H-4, 16, 19); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33).

$^{13}\text{C}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,50 (C-10); 74,13 (C-15,20); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1).

IE-EM:  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  597;  $m/z$  579, 561, 543, 281, 195, 95

Apéndice pág. 168-170.

**almuñequin**

PM: 638

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>8</sub>Configuración: *t/th - th/t/er*

UV:( máx MeOH) 215 nm

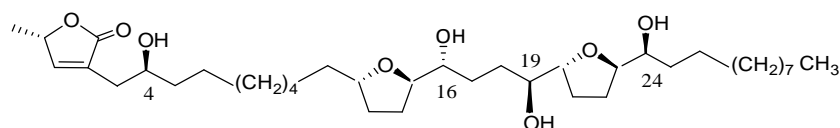
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3580, 2940, 2870, 1460, 1370, 1060, 960

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-34); 1,41 (H-37); 3,84 (H-24, 23, 20); 3,80 (H-15, 12); 3,41 (H-19); 3,41 (H-16); 3,61 (H-28).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm 14,1 (C-34); 19,2 (C-37); 71,6 (C-24); 82,0 (C-15); 79,3 (C-12); 77,4 (C-36); 82,4 (C-23); 74,6 (C-19); 82,2 (C-20); 74,5 (C-16); 134,3 (C-2); 149,0 (C-35); 173,9 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 639; m/z 621, 603, 585, 567, 549, 531, 433, 415, 363, 293, 275

Apéndice pág. 171-173.

**cherimolin-1**

PM: 638

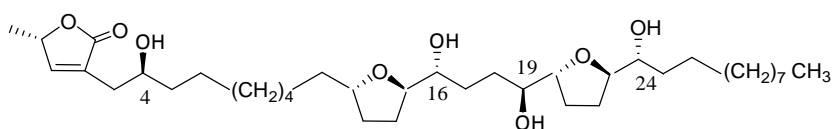
FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>8</sub>Configuración: *t/th - th/t/er*IR film (cm<sup>-1</sup>): 3590, 2930, 2856, 1750, 1460

<sup>1</sup>H RMN ( CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,86 (H-34); 1,4 (H-37); 5,02 (H-36); 7,16 (H-35); 2,49-2,37 (H-3a, 3b); 3,80 (H-4); 1,42 (H-5); 3,80 (H-12, 15, 20, 23, 24); 3,40 (H-16, 19).

<sup>13</sup>C RMN ( CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,01 (C-34); 18,99 (C-37); 69,78 (C-4); 37,27 (C-5); 79,25 (C-12); 81,93 (C-15); 74,45 (C-16); 74,33 (C-19); 83,26 (C-20); 82,19 (C-23); 174,53 (C-1); 131,04 (C-2); 151,75 (C-35); 77,88 (C-36).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 639; m/z, 621, 603, 585, 567

Apéndice pág. 174-176.

**cherimolin-2**

PM: 638

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>8</sub>Configuración: *t/th- th/t/th*

UV: ( máx EtOH) 210 nm

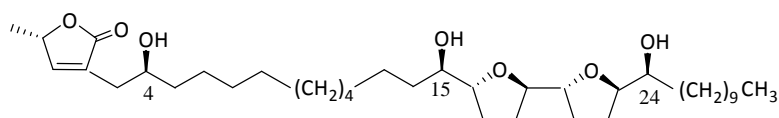
IR film (cm<sup>-1</sup>): 3540, 2940, 2870, 1750

<sup>1</sup>H RMN ( CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,82 (H-34); 1,39 (H-37); 5,00 (H-36); 7,16 (H-35); 2,48-2,34 (H-3a, 3b); 3,78 (H-4); 1,42 (H-5); 3,82 (H-12); 3,74 (H-15, 20, 23); 3,38 (H-12); 3,38 (H-16, 19, 24).

<sup>13</sup>C RMN ( CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,01 (C-34); 18,99 (C-37); 69,52 (C-4); 37,27 (C-5); 79,14 (C-12); 81,84 (C-15); 74,21 (C-16); 74,10 (C-19); 82,50 (C-20); 82,58 (C-23); 73,93 (C-24); 174,53 (C-1); 151,69 (C-35); 130,88 (C-2); 77,79 (C-36).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 639; m/z, 621, 603, 585, 567

Apéndice pág. 177-179.

**rolliniastatin-2**

PM: 622

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/er*

UV:( máx MeOH) 224 nm

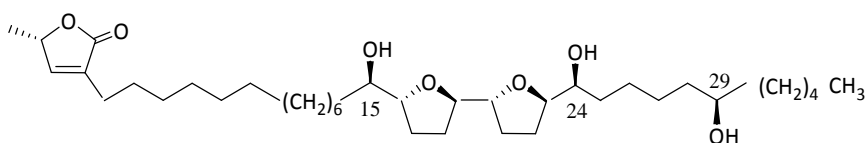
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3580, 3460, 2928, 2855, 1748

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-34); 1,44 (H-37); 3,41 (H-4); 3,84 (H-15, 24); 3,93 (H-16, 19, 20, 23); 5,05 (H-36); 7,20 (H-35).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,05 (C-34); 19,03 (C-37); 69,98 (C-4); 71,25 (C-24); 74,09 (C-15); 77,92 (C-36); 82,20 (C-23); 82,49 (C-19); 82,76 (C-20); 83,25 (C-16); 131,09 (C-2); 151,77 (C-35); 174,59 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 623; m/z 605, 587, 569, 551, 363, 345, 311, 293, 275

Apéndice pág. 180-182.

**motrilin**

PM: 622

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/er*

UV: ( máx EtOH) 211 nm

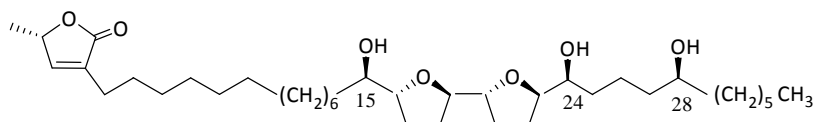
IR: film (cm<sup>-1</sup>): 3330, 2910, 2845, 1745, 1320, 1050, 945, 865, 750

<sup>1</sup>H RMN: ( CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 2,26 (H-3); 1,52 (H-4); 3,38 (H-15); 3,85 (H-16); 1,95-1,65 (H-17, 18, H-20, 21); 3,94 (H-19, 20); 6,97 (H-35); 4,98 (H-36); 1,41 (H-37).

<sup>13</sup>C RMN: ( CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 173,8 (C-1); 134,2 (C-2); 25,1 (C-3); 27,3 (C-4), 74,1 (C-15); 83,2 (C-16); 82,5 (C-19); 82,7 (C-20); 82,1 (C-23); 71,3 (C-25); 37,4 (C-28); 71,7 (C-29); 37,2 (C-30).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 623; m/z, 605, 569, 551, 399, 347, 295

Apéndice pág. 183-185.

**squamocin**

PM: 622

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/er*

UV:( máx MeOH) 215 nm

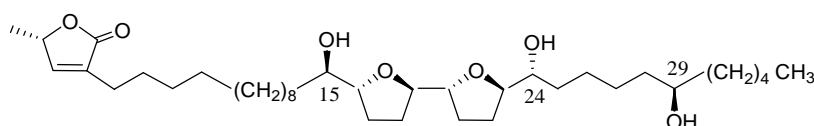
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3460, 3015, 2940, 2855, 1755

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,86 (H-34); 1,40 (H-37); 3,36 (H-15, 24); 3,57 (H-28); 3,84 (H-16, 19, 20, 23); 5,0 (H-36); 6,98 (H-35)

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,01 (C-34); 19,12 (C-37); 71,29 (C-24); 71,64 (C-28); 74,12 (C-15); 77,37 (C-36); 82,13 (C-20); 82,50 (C-19); 82,76 (C-23); 83,32 (C-16); 134,22 (C-2); 148,88 (C-35); 173,91 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 623; m/z 605, 587, 569, 345, 311, 295, 275.

Apéndice pág. 186-188.

**asiminecin**

PM: 622

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/th*

UV:( máx MeOH) 215 nm

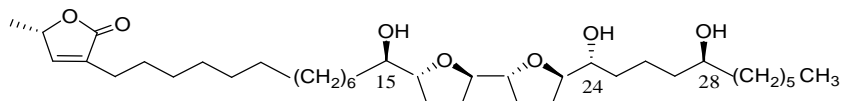
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 1752 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,89 (H-34); 1,41 (H-37); 3,40 (H-24, 15); 3,6 (H-29); 5,00 (H-36); 3,86 (H-23, 19,20, 16); 6,99 (H-35).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,15 (C-34); 19,27 (C-37); 74,07 (C-24); 73,89 (C-15); 71,81 (C-29); 77,40 (C-36); 83,05 (C-23); 81,82 (C-19); 81,78 (C-20); 83,17 (C-16); 134,25 (C-2); 148,78 (C-35); 173,83 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 623; m/z 295, 277, 365, 347, 435, 417, 551

Apéndice pág. 189-191.

**asiminacin**

PM: 622

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/th*

UV:( máx MeOH) 215nm

IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 1752 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-34); 1,41 (H-37); 3,40 (H-24, 15); 5,00 (H-36); 3,86 (H-23, 19,20, 16); 6,99 (H-35); 3,6 (H-28).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,15 (C-34), 19,27 (C-37), 74,07 (C-24), 73,89 (C-15), 77,40 (C-36); 83,19 (C-23); 81,78 (C-19); 81,85 (C-20); 83,05 (C-16); 134,25 (C-2); 148,78 (C-35); 173,83 (C-1); 71,73 (C-28).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 623; m/z 295, 277, 327, 309, 435, 115

Apéndice pág. 192-194.

## 2.5. *Annona montana* Macf.

Se la conoce vulgarmente como “sinini”. Es un árbol de 5-7 m de altura, de tallo tortuoso con corteza áspera; hojas alternas de 14-16 cm de largo y 4-6 cm de ancho (Fig. 2.5.). Posee flores perfectas, solitarias grandes de color blanco crema, su cáliz tiene tres sépalos triangulares pequeños; 6 pétalos en 2 verticilos, 3 internos más pequeños y 3 externos de 3-4 cm de largo (Fig. 2.6.). Su fruto es cordiforme y sincarpo de 15-20 cm de largo y 12-15 cm de ancho, pesan 1-3 Kg de color verde amarillento con espinas cortas y ganchosas, de pulpa blanca, jugosa, fibrosa y abundante. Contiene semillas pardas oscuras de 2 cm de largo y 0,6-0,7 cm de ancho



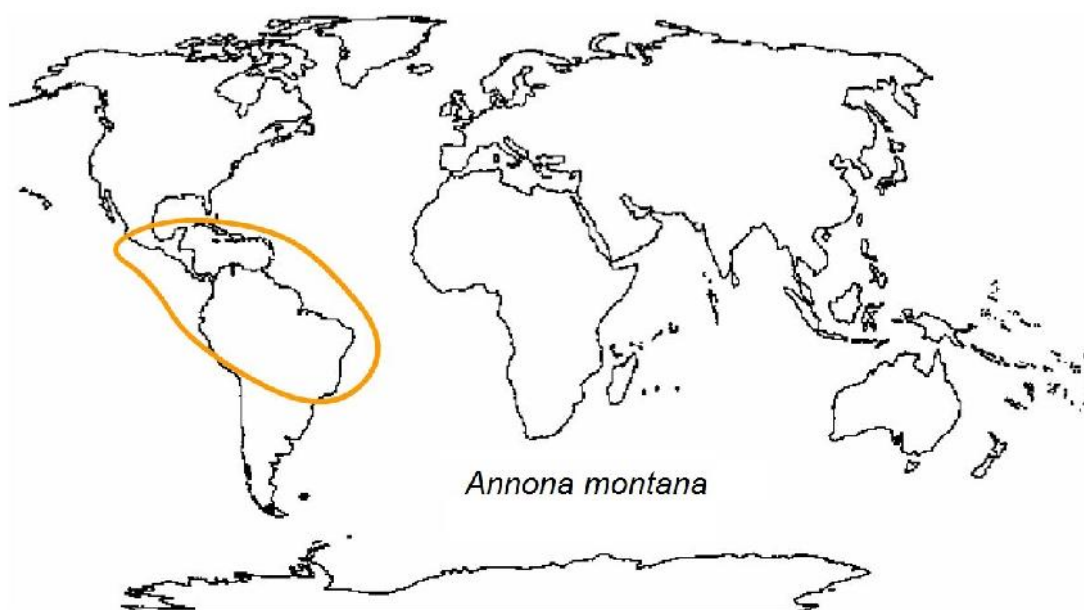
Figura 2.5. Ejemplar herborizado de *A. montana*.



Figura 2.6. Flores de *A. montana*.



**Ecología y distribución.** El "sinini" prefiere los terrenos arenosos con bastante humus, pero también prospera en cualquier terreno, especialmente en campos abiertos, o en bosques que antes fueron pampas, entonces se convierten en árboles corpulentos. Su área de dispersión es muy amplia y se lo encuentra en todos los países tropicales y subtropicales de América (Fig. 2.7.).



**Figura 2.7.** Zona de distribución de la *A. montana*.

**Usos.** Por su abundante pulpa y fragancia es de gran utilidad en la preparación de jugos y helados, de la corteza se extraen tiras largas y flexibles empleadas para amarrar (Fig. 2.8.).



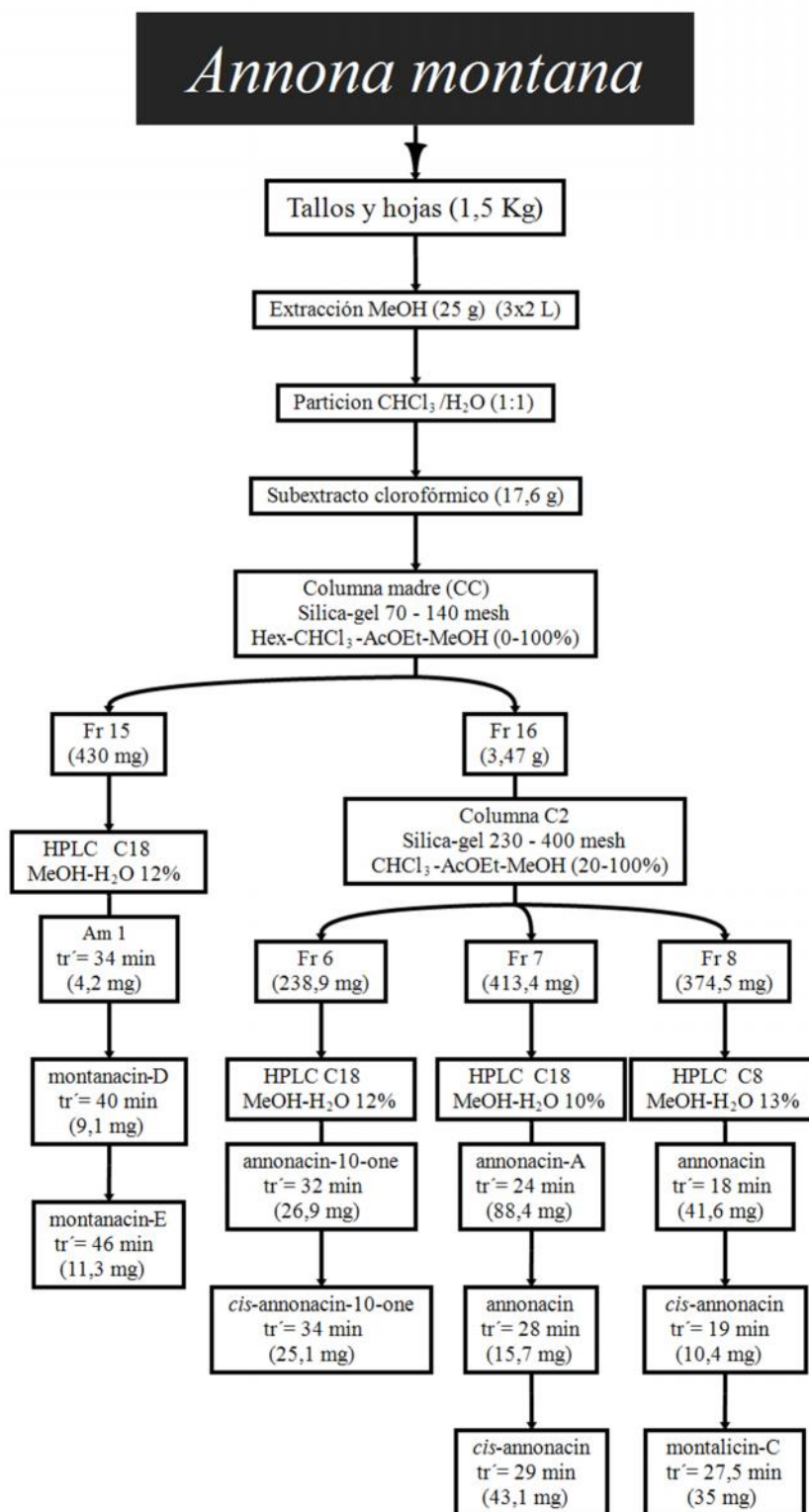
**Figura 2.8.** Fruto de *A. montana*.

### 2.5.1 Extracción y aislamiento de ACG naturales de *Annona montana*

A partir de 1,5 kg de tallos y hojas secas molidas de *A. montana* recolectada en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia (1999), se realizó una extracción con etanol (3x2 L). Luego de evaporar el solvente con evaporador rotatorio se obtuvieron 25 g de extracto metanólico. Se realizó la partición del extracto con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (1:1), obteniéndose 17,6 g de subextracto clorofórmico, el que fue procesado por CC de Silica-gel 70-140 Mesh, empleando mezclas Hexano-CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH (0-100%) como eluyente. Se obtuvieron 19 fracciones que fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles cromatográficos por CCF.

- ) La fracción **15** (430 mg) fue procesado por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu$ m, 10 mm x 250 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O (12%), flujo 2 mL/min; obteniéndose 4,2 mg de **Am 1**, nuevo producto natural (tr'=34 min); 9,1 mg de montanacin-D (tr'=40 min) y 11,3 mg de montanacin-E (tr'=46 min).
- ) La fracción **16** (3,47 g) fue procesada por cromatografía en columna de Silica-gel 230-400 Mesh, empleando mezclas de polaridad creciente: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH. Se obtuvieron 10 fracciones que fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles cromatográficos por CCF.
- ) La fracción **6** de la columna 2 (238,9 mg) fue procesada por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu$ m, 10 mm x 250 mm, MeOH-H<sub>2</sub>O (12%), flujo 2 mL/min; obteniéndose 26,9 mg de annonacin-10-one (tr'=32 min); 25,1 mg de *cis*-annonacin-10-one (tr'=34 min).
- ) La fracción **7** de la columna 2 (413,4 mg) fue procesada por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu$ m, 10 mm x 250 mm, MeOH-H<sub>2</sub>O (12%), flujo 2 mL/min; obteniéndose 88,4 mg de annonacin-A (tr'=24 min), 43,1 mg de *cis*-annonacin (tr'=28 min) y 56,7 mg de annonacin (tr'=29 min).
- ) La fracción **8** de la columna 2 (374,5 mg) fue procesada por HPLC, empleando una columna Phenomenex C8, 5  $\mu$ m, 10 mm x 250 mm, MeOH-H<sub>2</sub>O (13%), flujo 2 mL/min; obteniéndose 41,6 mg de annonacin (tr'=18 min), 10,4 mg de *cis*-annonacin (tr'=19 min) y 35 mg de montalicin-C (tr'=27,5 min).

A continuación, se describe de manera esquemática la metodología utilizada para el aislamiento y purificación de acetogeninas anonáceas.



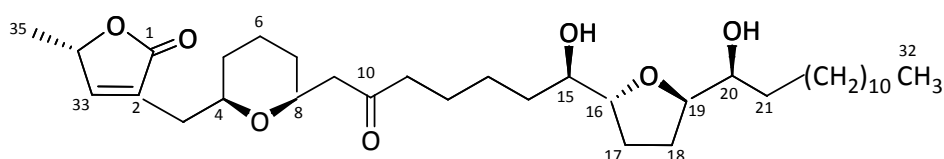
### 2.5.2. Acetogeninas anonáceas de *Annona montana*

El estudio químico de las hojas y tallos de *A. montana* condujo al aislamiento de una ACG nueva como producto natural **Am1** y ocho ACG previamente reportadas en la literatura, annonacin-10-one (Xu y col., 1989), *cis*-annonacin-10-one, *cis*-annonacin (Rieser y col., 1996), annonacin (McCloud y col., 1987), annonacin-A (Lieb y col. 1990), montanacin-D, montanacin-E (Wang y col., 2000) y montalicin-C (Liaw y col., 2004), las que fueron identificadas por sus características espectroscópicas en comparación con los datos de literatura previamente reportados.

#### Elucidación estructural de **Am1**

En el espectro de masas de **Am1**, por introducción directa, se observó el pico del ión quasimolecular a  $m/z$  575 uma, que asignamos como el ión molecular menos la pérdida de una molécula de agua  $[M+H]^+ - 1 H_2O$  (fórmula molecular  $C_{35}H_{60}O_7$ , PM 592). Los fragmentos a  $m/z$  575, 557 y 538 en el EM sugieren la presencia de grupos hidroxilos por pérdida consecutiva de moléculas de  $H_2O$  (Fig. 2.10).

Los espectros de RMN (Tabla 2.1) y EM de **Am1** resultaron similares a los de montanacin-D y montanacin-E, excepto por las pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos de los C-17 a C-21. Los resultados permitieron sugerir la presencia de un anillo *cis*-THP en C-4/C-8, un grupo carbonilo en C-10 y un anillo mono-THF con dos grupos OH flanqueantes entre C-16/C-19 (Fig. 2.9).



**Figura 2.9.** Estructura química de **Am1**.

La presencia de un anillo mono-THF con dos grupos OH flanqueantes fue establecido en C-16/C-19, por los fragmentos a  $m/z$  269, 305 y 357. La posición del grupo carbonilo se asigna en C-10 por el fragmento a  $m/z$  195 (ruptura al carbonilo) y el pico en  $^{13}C$ -RMN a  $\delta$  209.4 ppm. Se observa un fragmento intenso a  $m/z$  195 (100) que se asigna a la ruptura C-8/C-9 (Fig. 2.10).

Las señales en  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  28.7 y 25.1 (C-17 y C-18) y las señales de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  1.98 y 1.90 (H-17 e H-18) sugieren una estereoquímica relativa desde el C-15 al C-20 “*threo/trans/erythro*” que es la diferencia con montanacin-D y montanacin-E (*threo/trans/threo* y *threo/cis/threo*, respectivamente). La estereoquímica entre los C-15 y C-20 se pudo deducir por comparación con los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de montanacin-H (*threo/trans/erythro*), teniendo en cuenta los siguientes sistemas de spin:  $\delta$  1.39 y 1.37 (H-14, H-21), 3.39 y 3.88 (H-15, H-20), 3.81 y 3.88 (H-16, H-19), 1.98-1.90 (H-17, H-18);  $\delta$  33.0 (C-14), 74.1 (C-15), 83.1 (C-16), 28.7 y 25.1 (C-17 y C-18), 82.2 y 71.6 (C-19 y C-20) y 32.1 (C-21). Las señales a  $\delta$  75.6 (C-4), 31.8-32.0 (C-5/C-7) y 74.1 (C-8);  $\delta$  3.59 (H-4), 1.26 (H-5/H-7) y 3.84 (H-8), sugieren la presencia de un anillo *cis*-THP (Tabla 2.1, Fig. 2.11, 2.12, 2.13 y 2.14).

Las correlaciones espaciales observadas por el efecto nuclear Overhauser (NOESY) entre los H-19 e H-20 ( $\delta$  3.88 y 3.83), los H19 e H18 ( $\delta$  3.88 y 1.85) y los H15 e H16 ( $\delta$  3.36 y 3.83) nos permitieron establecer la estereoquímica relativa del anillo mono-THF desde el C-15 al C-20 como “*threo/trans/erythro*” (Fig. 2.14). La correlación espacial observada por NOESY entre H-4 e H-8 ( $\delta$  3.59 y 3.83) permitió confirmar la estereoquímica *cis* en el anillo THP (Fig. 2.15).

Las moléculas con un anillo no-adyacente THP junto con un anillo THF son del tipo de acetogeninas de las más inusuales descubiertas hasta el momento. Es de destacar, que hasta la fecha sólo se han reportado 4 ACG de este tipo aisladas todas de *Annona montana* (Wang y col., 2000 y 2001).

Debido a la semejanza con estructuras previamente reportadas, nombramos a **Am1** como **montanacin-K**.

**Tabla 2.1.**  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN (400 MHz) en  $\text{CDCl}_3$ 

$^1\text{H}$	ppm	$^{13}\text{C}$	ppm
1	-	1	174.2
2	-	2	130.6
3	2.37	3	31.9
4	3.59	4	75.6
5-7	1.26	5-7	31.8-32.0
8	3.84	8	74.1
9	2.63	9	49.1
10	-	10	209.4
11	2.44	11	43.8
12	1.56	12	23.5
13	1.30	13	31.9
14	1.39	14	33.0
15	3.39	15	74.1
16	3.81	16	83.1
17	1.98	17	28.7
18	1.90	18	25.1
19	3.88	19	82.2
20	3.81	20	71.6
21	1.37	21	32.1
22-29	1.18-1.33	22-29	29.0
30	1.30	30	32.0
31	1.30	31	22.7
32	0.88	32	14.1
33	7.15	33	151.3
34	5.00	34	77.8
35	1.41	35	19.1

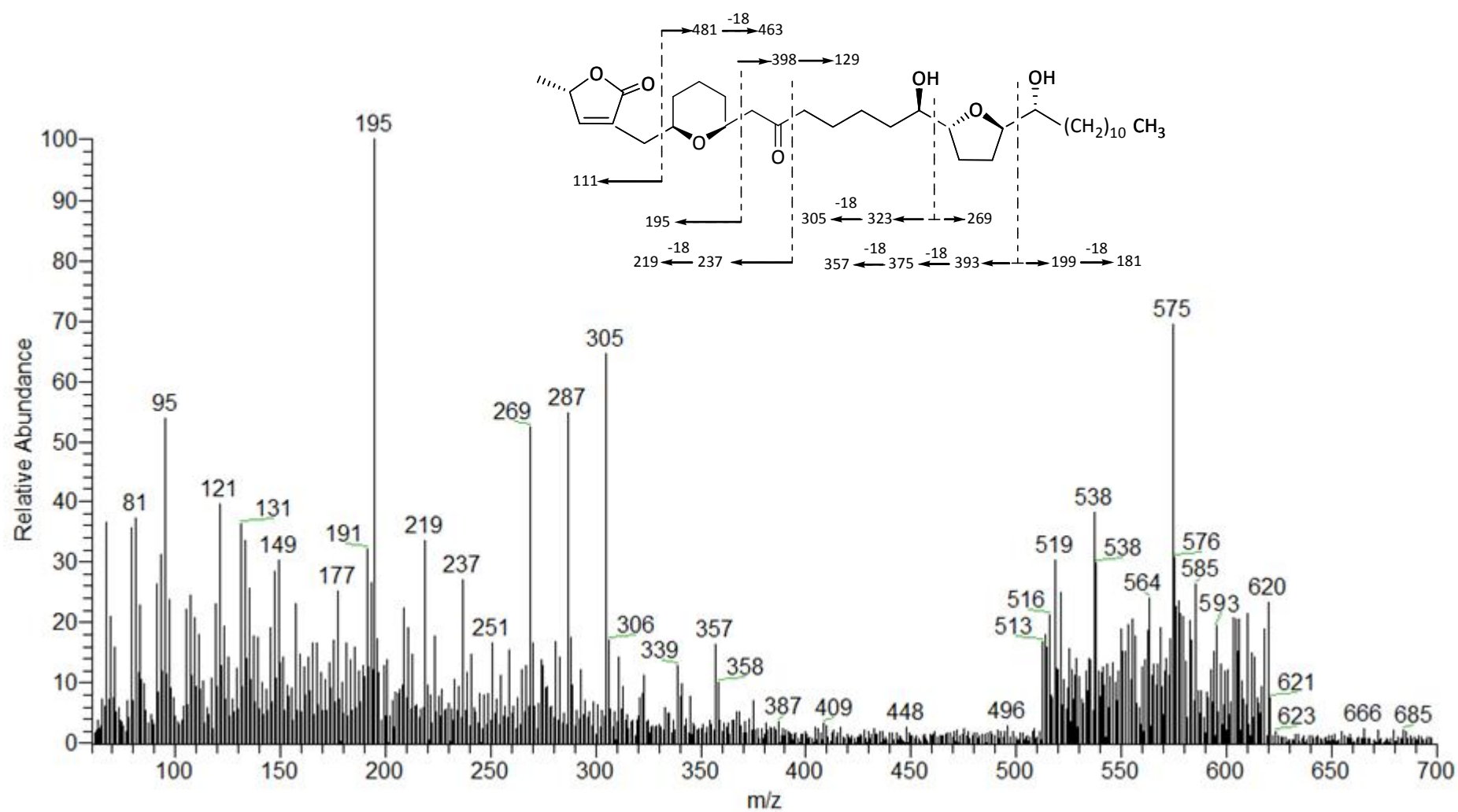


Figura 2.10. Fragmentación de montanacin-K (IE a 70 eV)

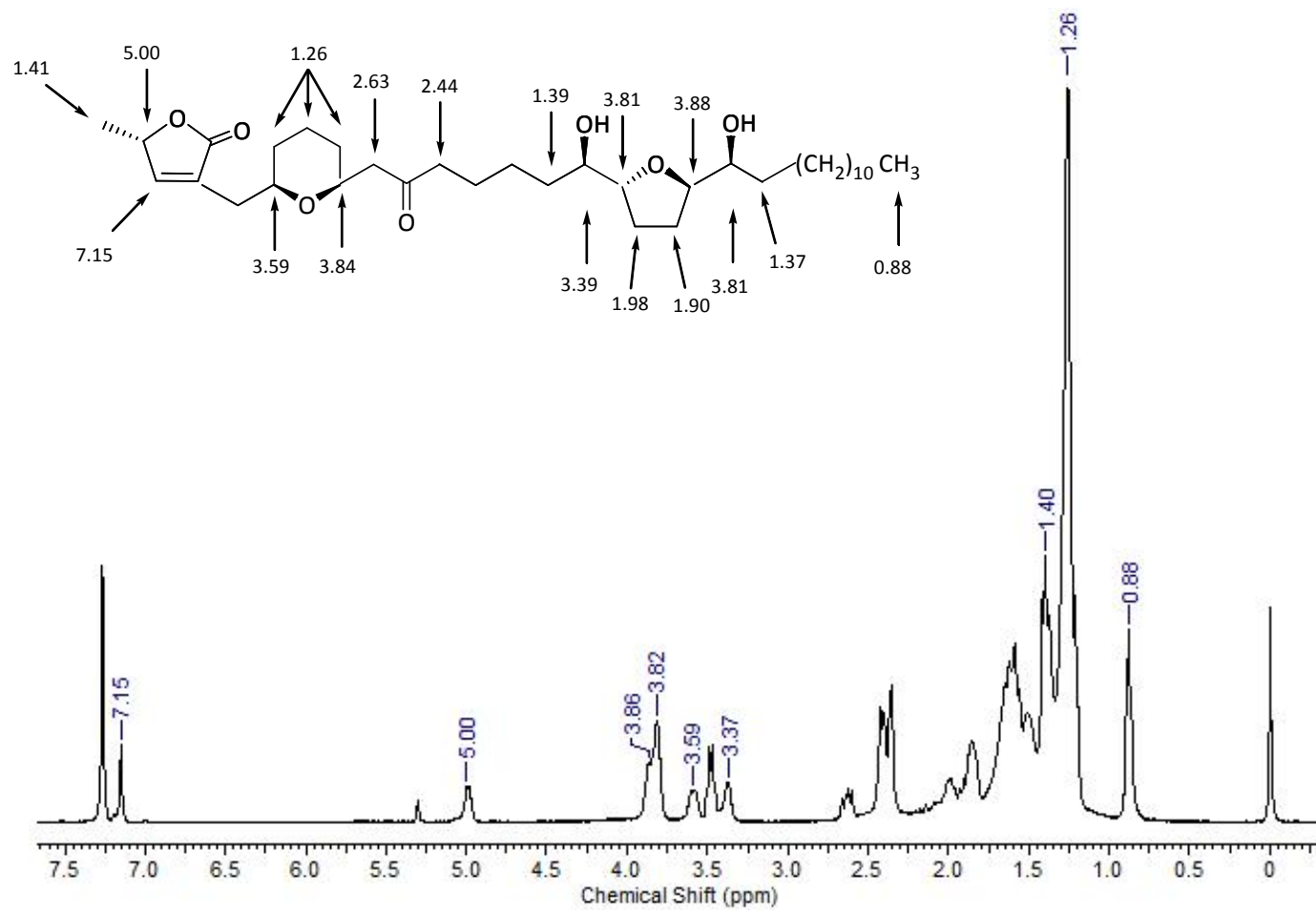


Figura. 2.11. <sup>1</sup>H-RMN de montanacin-K (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



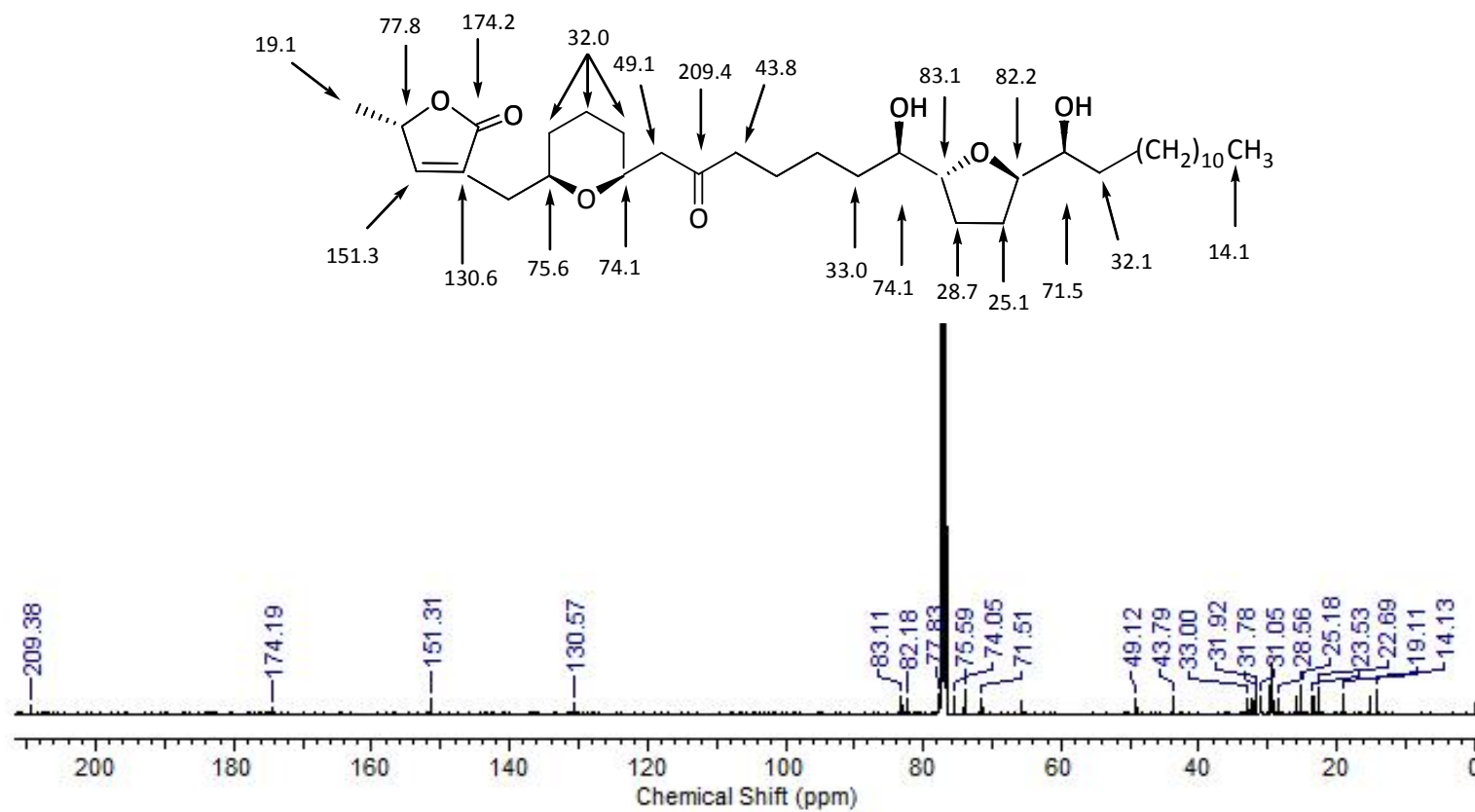
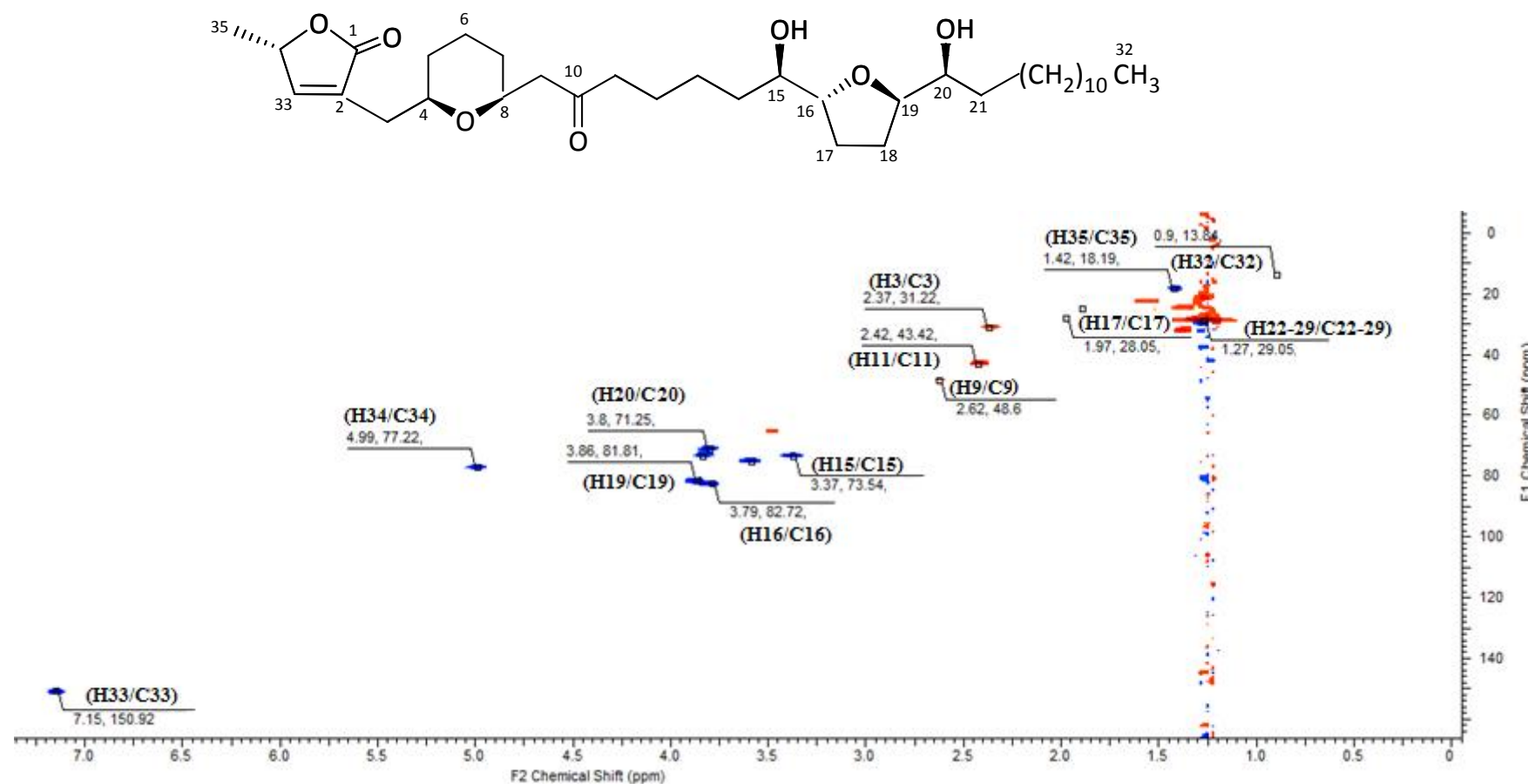
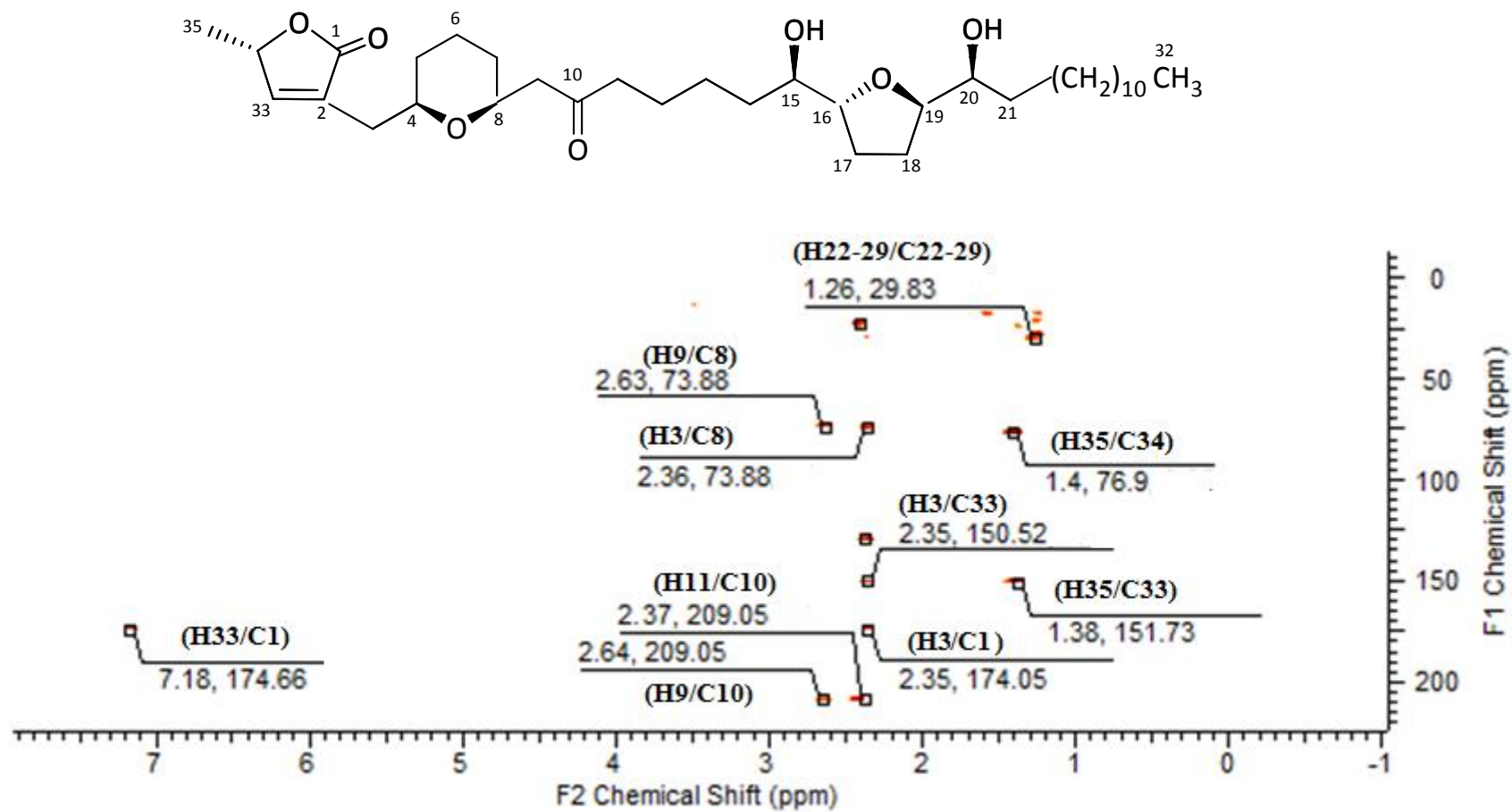
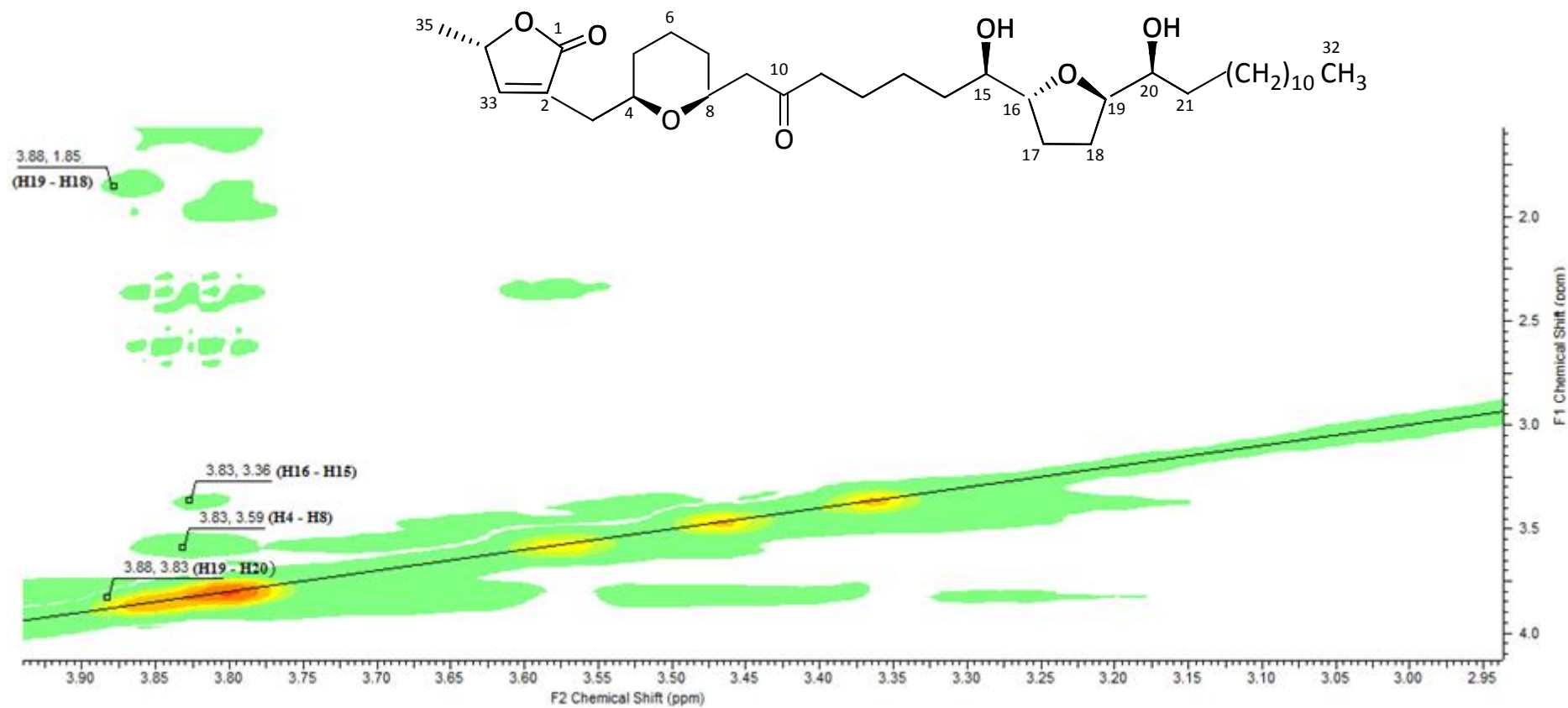


Figura 2.12.  $^{13}\text{C}$ -RMN de montanacin-K (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

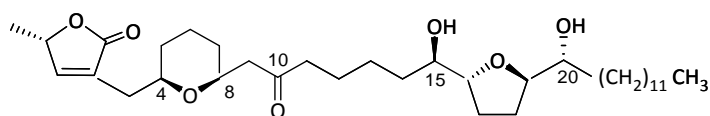
Figura 2.13. HSQC de montanacin-K (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

Figura 2.14. HMBC de montanacin-K ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Figura 2.15. NOESY de montanacin-K (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

A continuación, se listan los datos de bibliografía correspondientes a cada uno de los compuestos conocidos identificados (PM, fórmula molecular, configuración relativa de sus sistemas THF, estructura, UV, IR,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN y MS).

### montanacin-D



PM: 592

FM:  $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_7$

Configuración: *c-th/t/th*

UV: ( *máx* MeOH) 220 nm.

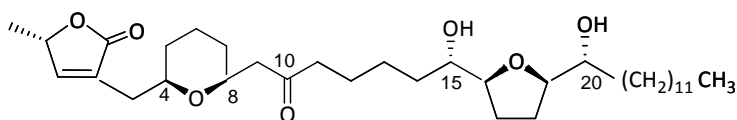
IR: ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3440,1750

$^1\text{H}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,59 (H-4); 3,81 (H-16, 19); 4,99 (H-34); 7,14 (H-33); 3,85 (H-8); 2,37 (H-11); 1,68 (H-17); 1,98 (H-18).

$^{13}\text{C}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 19,01 (C-35); 75,7 (C-4); 209,2 (C-10); 74,10 (C-8, 15,20); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1); 49,20 (C-9); 28,7 (C-17, 18); 43,8 (C-11).

IE-EM:  $[\text{M}^+\text{H}]^+593$ ;  $m/z$  574, 556, 375, 357, 323, 305, 269, 237, 219, 195, 181

Apéndice pág. 195-198.

**montanacin-E**

PM: 592

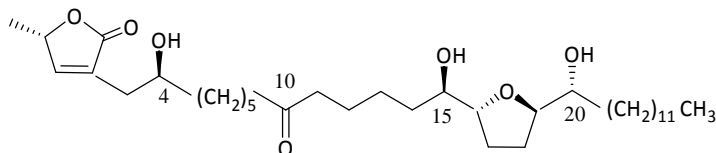
FM: C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *c-th/c/th*UV: ( *máx* MeOH) 225 nm.

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,59 (H-4); 3,81 (H-16, 19); 4,99 (H-34); 7,14 (H-33); 3,85 (H-8); 2,37 (H-11); 1,75 (H-17); 1,95 (H-18).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 19,01 (C-35); 75,7 (C-4); 209,2 (C-10); 74,10 (C-8, 15,20); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1); 49,20 (C-9); 28,7 (C-17, 18); 43,8 (C-11).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>593; m/z 574, 556, 375, 323, 305, 269, 195, 181, 129, 111

Apéndice pág. 199-202.

**annonacin-10-one**

PM: 594

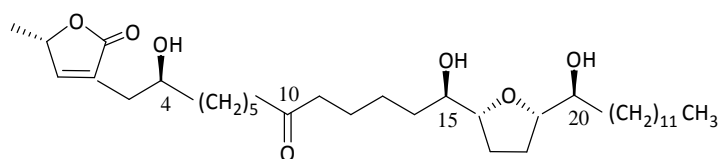
FM: C<sub>35</sub>H<sub>62</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th*UV: ( *máx* MeOH) 215 nmIR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3444, 2918, 2850, 1700, 1749, 1467

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,87 (H-32); 1,44 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,82 (H-4, 16, 19); 5,04 (H-34); 7,21 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,08 (C-32); 19,02 (C-35); 69,71 (C-4); 74,27 (C-15, 20); 78,04 (C-34); 130,93 (C-2); 152,07 (C-33); 174,76 (C-1); 204,86 (C-10).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>595; m/z 577, 559, 541, 523, 505, 307, 289, 195, 95

Apéndice pág. 203-206.

**cis-annonacin-10-one**

PM: 594

FM: C<sub>35</sub>H<sub>62</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/c/th*

UV: ( máx MeOH) 209 nm

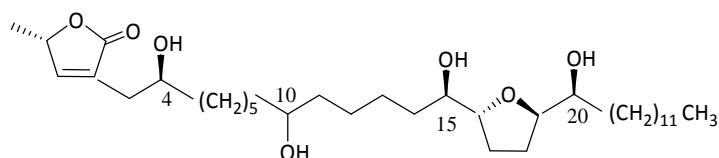
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3444, 2918, 2850, 1700, 1749, 1467

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,87 (H-32); 1,44 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,82 (H-4, 16, 19); 1,76 (H-17); 1,94 (H-18); 5,04 (H-34); 7,21 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,08 (C-32); 19,02 (C-35); 69,71 (C-4); 74,27 (C-15, 20); 28,2 (C-17, 18); 78,04 (C-34); 82,72 (C-16, 19); 130,93 (C-2); 152,07 (C-33); 174,76 (C-1); 204,86 (C-10).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>595; m/z 577, 559, 541, 523, 505, 307, 289, 195, 95

Apéndice pág. 207-210.

**annonacin-A**

PM: 596

FM: C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/er*

UV: ( máx MeOH) 218 nm.

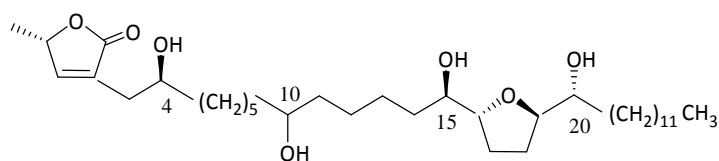
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3420, 1740, 1460, 850

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,41 (H-15); 3,60 (H-10); 3,81 (H-4, 16, 19, 20); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,50 (C-10, 20); 74,13 (C-15); 78,00 (C-34); 82,3 (C-16), 83,3 (C-19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>597; m/z 579, 561, 543, 309, 291, 241, 223, 397, 379

Apéndice pág. 211-213.

**annonacin**

PM: 596

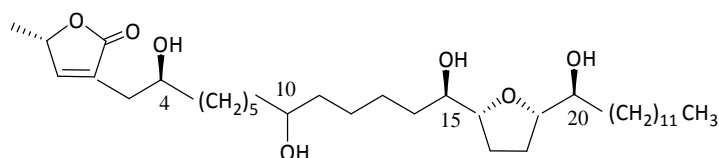
FM: C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th*UV: ( *máx* MeOH) 218 nm.IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3440,1750

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,60 (H-10); 3,81 (H-4, 16, 19); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,50 (C-10); 74,13 (C-15,20); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>597; m/z 579, 561, 543, 281, 195, 95

Apéndice pág. 168-170.

**cis-annonacin**

PM: 596

FM: C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/c/th*UV: ( *máx* MeOH) 215 nmIR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3395, 2920, 2851, 1734, 1469

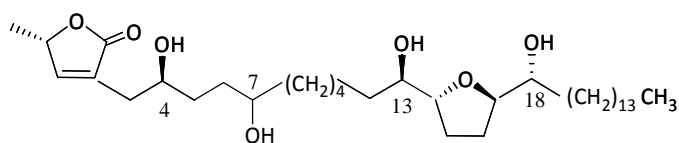
<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,60 (H-10); 1,76 (H-17); 1,94 (H-18); 3,81 (H-4, 16, 19); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,50 (C-10); 74,13 (C-15,20); 78,00 (C-34); 28,2 (C-17, 18); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>597; m/z 579, 561, 543, 281, 195, 95

Apéndice pág. 214-216.



**montalicin-C**

PM: 596

FM: C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th*UV: ( *máx* MeOH) 208 nm.IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3424, 2919, 2850, 1750

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,44 (H-13); 3,39 (H-18); 3,61 (H-7); 3,81 (H-4, 14, 17); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,40 (C-4); 74,1 (C-18); 74,3 (C-13); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>597; m/z 579, 561, 543, 369, 351, 333, 281, 263, 245, 227, 199, 95

Apéndice pág. 217-220.

## 2.6. *Annona muricata* L.

Se la conoce vulgarmente como “guanábana”, es un árbol pequeño de hojas obovado-oblongas, brevemente acuminadas, de 10-20 cm de largo (Fig. 2.16.); de flores amarillas de 3-5 cm de diámetro con los 6 pétalos bien desarrollados (Fig. 2.17.); su fruto es ovoide a veces cordado en la base de 15 a 20 cm de largo, verde, cubierto de espinas curvadas hacia el ápice, de pulpa blanca, acida y semillas oscuras.

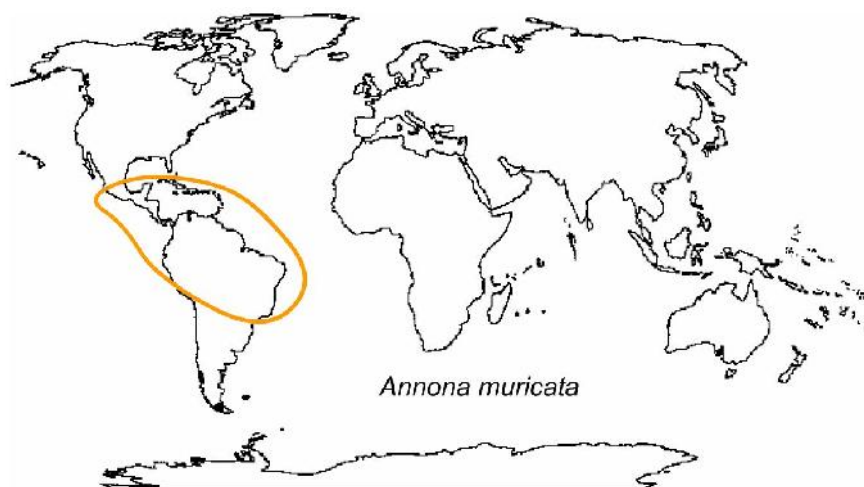


**Figura 2.16.** Ejemplar herborizado de *A. muricata*.



**Figura 2.17.** Flores de *A. muricata*.

**Ecología y distribución.** La Guanábana se encuentra en las zonas tropicales de América (Fig. 2.18.).



**Figura 2.18.** Zona de distribución de la *A. muricata*.

**Usos.** Por su abundante pulpa es comestible, se ha comenzado su comercialización en frascos que contienen sólo la pulpa y permiten conservar su contenido por meses. También, se venden helados, licor, jugo, dulces y tortas; además, con las diferentes partes del árbol se preparan cremas y tónicos, que sirven para curar afecciones del cuerpo (Fig. 2.19.).



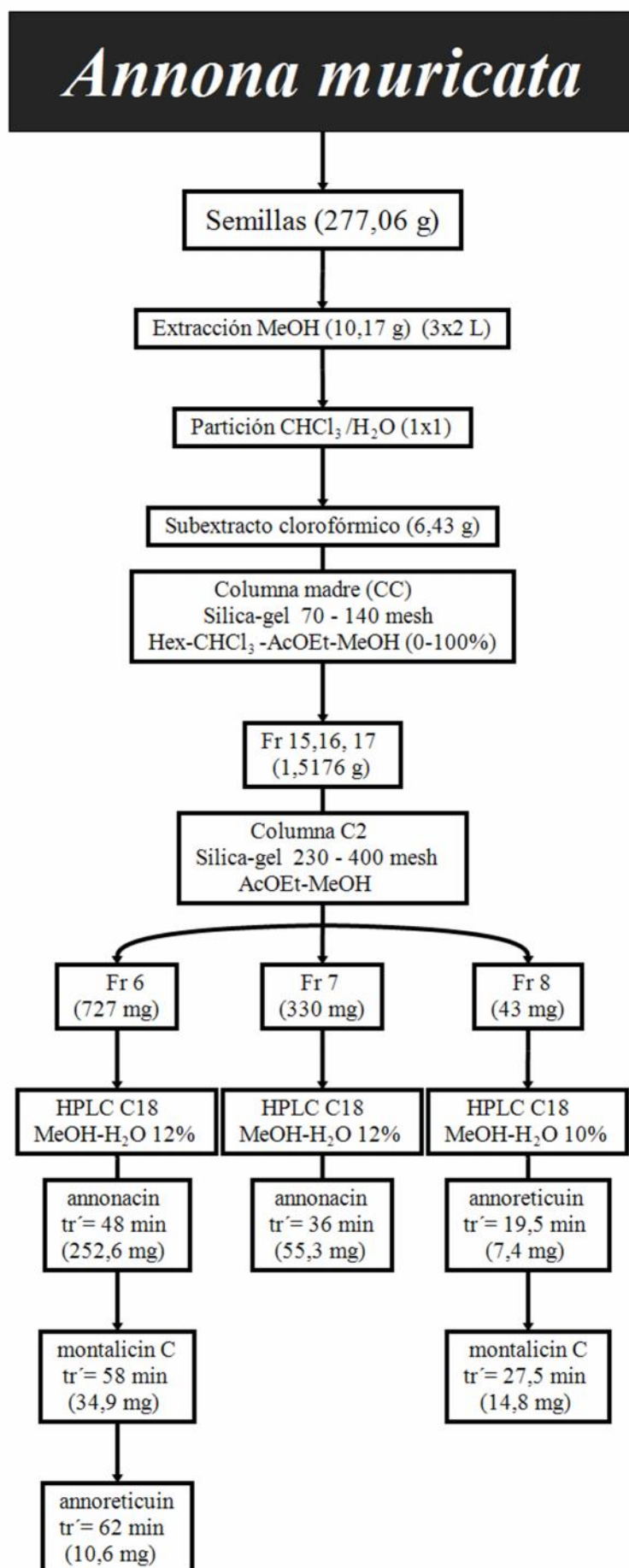
**Figura 2.19.** Fruto de *A. muricata*.

### 2.6.1. Extracción y aislamiento de ACG naturales de *Annona muricata*

A partir de 272,85 g de semillas secas y molidas de frutos de *A. muricata* recolectada en Pernambuco, Brasil (2011), se realizó una extracción con metanol (3x2 L). Luego de evaporar el solvente con evaporador rotatorio se obtuvieron 10,16 g de extracto metanólico. Se realizó la partición del extracto con una mezcla de  $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$  (1:1), obteniéndose 6,43 g de subextracto clorofórmico, el que fue procesado por CC de Silica-gel 70-140 Mesh, empleando mezclas de polaridad creciente de hexano- $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt-MeOH}$  (0-100%), como eluyente. Se obtuvieron 21 fracciones que fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles cromatográficos por CCF.

- J Las fracciones **15, 16 y 17** (1,52 g) fueron reunidas y procesadas por CC de Silica-gel 230-400 Mesh, empleando mezclas  $\text{AcOEt-MeOH}$  (20:80); como resultado del proceso se obtuvieron 9 fracciones.
- J La fracción **6** (727,1 mg) de la columna 2, fue procesada por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm x 250 mm,  $\text{MeOH:H}_2\text{O}$  (12%), flujo 1,5 mL/min; obteniéndose 252,6 mg de annonacin ( $\text{tr}'=48$  min); 34,9 mg de montalicin-C ( $\text{tr}'=58$  min) y 10,6 mg de annoreticuín ( $\text{tr}'=62$  min).
- J La fracción **7** (330 mg) de la columna 2, fue procesada por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm x 250 mm,  $\text{MeOH:H}_2\text{O}$  (12%), flujo 2 mL/min; obteniéndose 55,3 mg de annonacin ( $\text{tr}'=36$  min).
- J La fracción **8** (43,3 mg) de la columna 2, fue procesada por HPLC, empleando una columna Phenomenex C18, 5  $\mu\text{m}$ , 10 mm x 250 mm,  $\text{MeOH:H}_2\text{O}$  (10%), flujo 1,5 mL/min; obteniéndose 7,4 mg de annoreticuín ( $\text{tr}'=19,5$  min) y 14,8 mg de montalicin-C ( $\text{tr}'=27,5$  min).

A continuación, se describe de manera esquemática la metodología utilizada para el aislamiento y purificación de acetogeninas annonaceas.

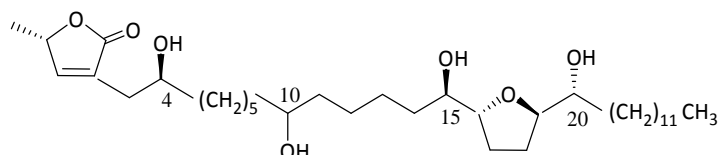


### 2.6.2. Acetogeninas anonáceas de *Annona muricata*

El estudio químico de las semillas de *A. muricata* condujo al aislamiento de tres ACG, annonacin (McCloud y col., 1987), montalicin-C (Liaw y col., 2004) y annoreticuín (Wu y col., 1992), las que fueron identificadas por sus características espectroscópicas en comparación con los datos de literatura previamente reportados.

A continuación, se listan los datos de bibliografía correspondientes a cada uno de los compuestos identificados (PM, fórmula molecular, configuración relativa de sus sistemas THF, estructura, UV, IR,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN, MS).

#### annonacin



PM: 596

FM:  $\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_7$

Configuración: *th/t/th*

UV: (  $\text{máx MeOH}$ ) 218 nm

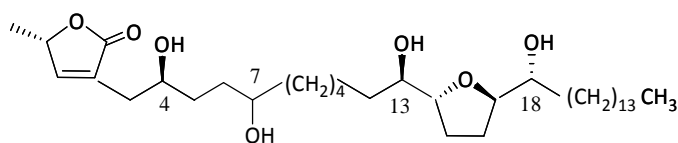
IR: ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3440, 1750

$^1\text{H}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,41 (H-15, 20); 3,60 (H-10); 3,81 (H-4, 16, 19); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33).

$^{13}\text{C}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) ppm: 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,50 (C-10); 74,13 (C-15,20); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1).

IE-EM:  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  597;  $m/z$  579, 561, 543, 281, 195, 95

Apéndice pág. 168-170.

**montalicin-C**

PM: 596

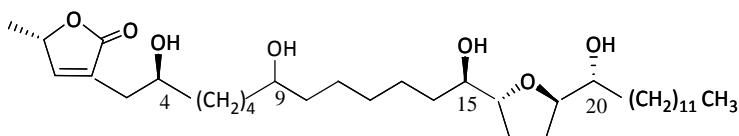
FM: C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th*UV: ( *máx* MeOH) 208 nm.IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3424, 2919, 2850, 1750

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,44 (H-13); 3,39 (H-18); 3,61 (H-7); 3,81 (H-4, 14, 17); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,40 (C-4); 74,1 (C-18); 74,3 (C-13); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>597; m/z 579, 561, 543, 369, 351, 333, 281, 263, 245, 227, 199, 95

Apéndice pág. 217-220.

**annoreticuín**

PM: 596

FM: C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th*UV: ( *máx* MeOH) 218 nm.IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3440, 1750

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-32); 1,42 (H-35); 3,39 (H-15, 20); 3,60 (H-9); 3,81 (H-4, 16, 19); 5,05 (H-34); 7,21 (H-33); 1,68 (H-17); 1,98 (H-18).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm 14,04 (C-32); 18,99 (C-35); 69,69 (C-4); 71,50 (C-9); 74,13 (C-15,20); 78,00 (C-34); 82,68 (C-16, 19); 130,98 (C-2); 151,95 (C-33); 174,70 (C-1); 28,7(C-17, 18).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>597; m/z 561, 543, 397, 361, 327, 309, 291, 281, 273, 245, 227, 209, 191

Apéndice pág. 221-224.



## 2.7. *Annona cherimolia* Mill.

Se conoce comúnmente como “chirimoya”, nombre que proviene del quechua "*chiri*" (fría) y "*muya*" (semillas), que hace referencia al hecho que germinan a elevadas altitudes. Es un árbol pequeño que raramente alcanza los 7 a 8 metros de altura. Las hojas, con peciolo de 6-12 mm, son simples de forma ovaladas y con el envés tomentoso (Fig. 2.20.). Las flores de pétalos amarillentos jaspeados de púrpura, son muy aromáticas, poco llamativas y en ramilletes de dos o tres, sobre un corto e inclinado pedúnculo inserto en las axilas de las hojas (Fig 2.21.). El fruto es un sincarpo, ya que cada segmento del mismo, contiene una única semilla dura de color negro en forma de judía. Tiene la pulpa blanca, cremosa y un fuerte aroma que recuerda a una mezcla de frutilla, banana y ananá.



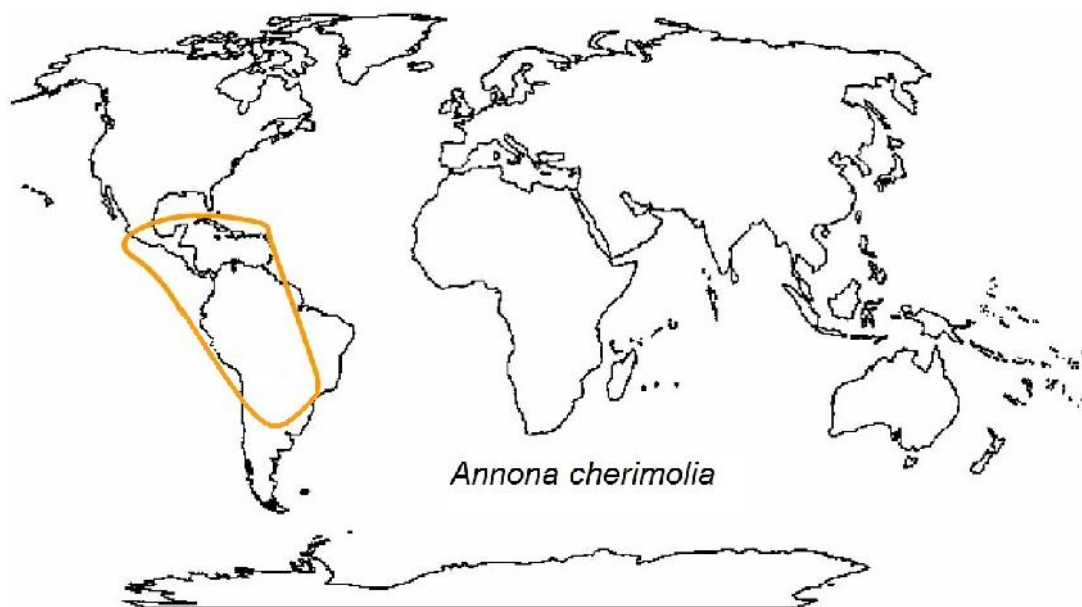
Figura 2.20. Ejemplar herborizado de *A. cherimolia*.



Figura 2.21. Flores de *A. cherimolia*.



**Ecología y distribución.** Crece espontáneamente desde las mesetas centrales de Méjico, en América Central hasta buena parte de las regiones subtropicales de América del Sur. Sin embargo, se estima que su origen está ubicado en las zonas montañosas del sur de Ecuador y lugares limítrofes con Perú, desde donde se difundió a las zonas antes citadas (Fig. 2.22.).



**Figura 2.22.** Zona de distribución de la *A. cherimolia*.

**Usos.** La pulpa de chirimoya madura se consume con mayor frecuencia fresca o en forma de helados, bebidas refrescantes y agregadas a ensaladas de frutas. El fruto se ha utilizado fermentado para producir bebidas alcohólicas; las semillas de la “chirimoya” reducidas a polvo y mezcladas con ceniza se emplean como un potente insecticida en algunos países (Fig. 2.23.).

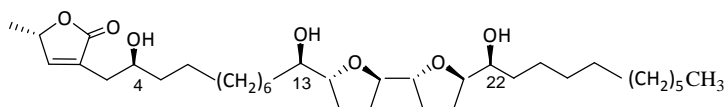


**Figura 2.23.** Frutos de *A. cherimolia*.

### 2.7.1 ACG empleadas en los bioensayos que fueron previamente aisladas e identificadas de *Annona cherimolia* por nuestro grupo de trabajo

A continuación, se listan los datos de bibliografía correspondientes a cada uno de las ACG empleadas en los bioensayos (PM, fórmula molecular, configuración relativa de sus sistemas THF, estructura, UV, IR,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN, MS).

#### molvizarin



PM: 594

FM: C<sub>35</sub>H<sub>62</sub>O<sub>7</sub>

Configuración: *th/t/th/t/er*

UV: ( máx MeOH) 215 nm

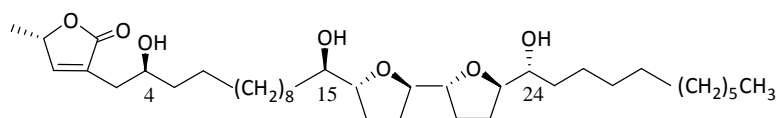
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3420, 2920, 2845, 1755, 1460, 1315, 1195, 1055, 950, 750

$^1\text{H}$  RMN ( CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 2,50 (H-3a); 2,35 (H-3b); 3,84 (H-4); 3,37 (H-13); 3,84 (H-14); 1,96 (H-15, 16); 1,62 (H-19, 20); 3,84 (H-21, 22); 7,16 (H-33); 5,04 (H-34); 1,42 (H-35).

$^{13}\text{C}$  RMN ( CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 174,53 (C-1); 131,00 (C-2); 33,12 (C-3); 69,77 (C-4); 74,02 (C-13); 83,18 (C-14); 82,44 (C-17); 82,71 (C-18); 82,13 (C-21); 71,26 (C-22); 37,25 (C-5).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 623; m/z 605, 569, 551, 399, 347, 295

Apéndice pág. 225-226.

**asimicin**

PM: 622

FM: C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/th*

UV: ( máx MeOH) 208 nm

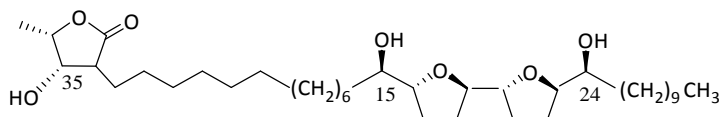
IR:(CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 1750

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,86 (H-34); 1,40 (H-37); 3,36 (H-15, 24); 3,83 (H-4); 3,8-3,9 (-16,19, 20, 23); 5,05 (H-36); 7,18 (H-35).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,11 (C-34); 19,10 (C-37); 69,96 (C-4); 74,06 (C-15, 24); 77,99 (C-36); 81,80 (C-19, 20); 83,18 (C-16, 23); 131,16 (C-2); 151,83 (C-35); 174,66 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>623; m/z 605, 587, 569, 311, 293

Apéndice pág. 227-229.

**laherradurin**

PM: 624

FM: C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/er*

UV: ( máx MeOH) 205 nm

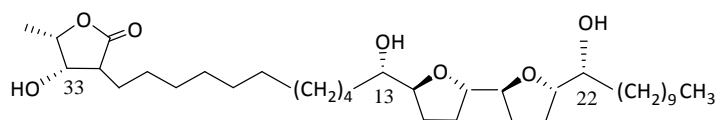
IR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3590, 2930, 2860, 1765, 1450

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,88 (H-34); 1,35 (H-37); 3,87 (H-4, 16, 19, 20, 23); 4,18(H-15, 24, 35); 4,53 (H-36).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,05 (C-34); 18,01 (C-37); 43,70 (C-2); 71,26(C-24); 73,49 (C-35); 74,13 (C-15); 82,18 (C-23); 82,58 (C-19); 82,73 (C-20); 83,24 (C-16); 177,69 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 625; m/z 607, 589, 571, 553, 535, 399, 347, 313, 295

Apéndice pág. 230-232.

**itrabin**

PM: 596

FM: C<sub>35</sub>H<sub>64</sub>O<sub>7</sub>Configuración: *th/t/th/t/er*UV: (  $\lambda_{\text{máx}}$  MeOH) 210 nmIR: (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>) 1765

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) ppm: 0,87 (H-32); 1,34 (H-35); 3,86 (H-14, 17, 18, 21); 4,18 (H-13, 22); 4,49 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) ppm: 14,05 (C-32); 18,05 (C-35); 43,72 (C-2); 71,33 (C-22); 73,59 (C-33); 74,12 (C-13); 82,21 (C-21); 82,54 (C-14); 82,77 (C-17); 83,25 (C-18); 177,54 (C-1).

IE-EM: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup> 597; m/z 579, 561, 543, 525, 507, 371, 319, 267

Apéndice pág. 233-235.

## 2.8. Modificación estructural de las ACG naturales

Shimada y cols. (1998 a,b), establecieron que los anillos THF debían interaccionar fuertemente con las terminaciones polares de los fosfolípidos de las membranas liposomales y propusieron que estos anillos THF conjuntamente con los grupos hidroxilo flanqueantes actuarían como ancla hidrofílica a la membrana para optimizar la posición y conformación de los grupos funcionales de las ACG. Los diversos factores estructurales que componen las ACG juegan un papel fundamental en la actividad biológica de estas moléculas. Se piensa que estos sistemas THF hidroxilados son los que provocan una diferente flexibilidad en el plegamiento de la cadena alquílica, lo que justificarían las diferencias en la potencia y cinética de la actividad de las ACG.

Ante los antecedentes que evidencian la importancia de la presencia tanto de la  $\gamma$ -lactona, como de los sistemas THF hidroxilados, se decidió evaluar los requerimientos moleculares estructurales de las ACG, que permitieran diseñar derivados sintéticos selectivos en su acción biológica. Para ello, nos propusimos realizar modificaciones estructurales a nivel del dominio polioxigenado de las mismas. Preparamos derivados acetilados (OAc) de ACG mono y bis-THF a través de métodos químicos y enzimáticos, como así también, derivados metoximetilados (MOM) de ACG bis-THF.

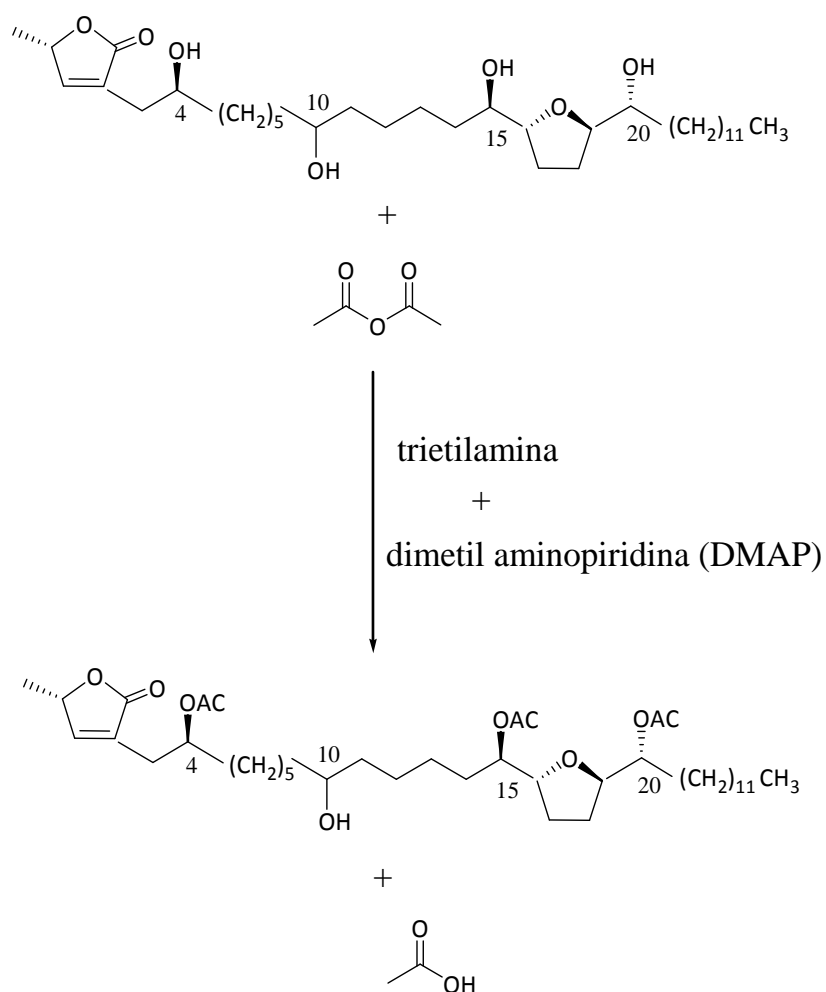
### 2.8.1. Obtención de derivados acetilados

Los análogos acetilados de las ACG naturales, annonacin, *cis*-annonacin-10-one, motrilin, squamocin, molvizarin, asimicin y rolliniastatin-2, fueron obtenidos mediante acetilación química, mientras que los análogos de las  $\gamma$ -OH ACG naturales, laherradurin e itrabin fueron obtenidos por acetilación enzimática.

#### 2.8.1.1. Acetilación química

A una solución de la ACG a acetilar (40 mg, 0,05 mmol) (Fig. 2.24) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (2 ml), a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno, se le agregó trietilamina (57  $\mu\text{L}$ , 0.4 mmol), seguido de anhídrido acético (90  $\mu\text{L}$ , 10 mmol) y una cantidad catalítica de dimetil aminopiridina (DMAP) (Fig. 2.25). La solución se agitó hasta ausencia de reactivo y se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL). La fase acuosa alcalina se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  y la fase orgánica combinada se lavó sucesivamente con solución de  $\text{CuSO}_4$  (x1), con solución

de NaCl (x2) y finalmente se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El residuo obtenido luego de la evaporación del disolvente se cromatografía por CCF. Los compuestos de interés fueron purificados por CC con Silica flash (25-40  $\mu$ m, 60 Å de poro) como fase estacionaria y hexano/AcOEt con cantidades crecientes de AcOEt (30-100%) como fase móvil (Fig. 2.26).



**Figura 2.24.** Ecuación química general de acetilación.



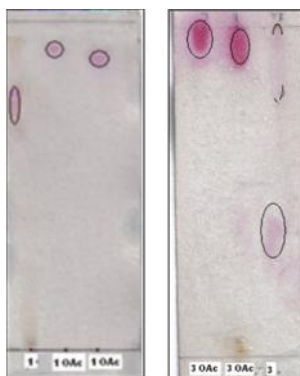
**Figura 2.25.** Acetilación química de las ACG naturales.



**Figura 2.26.** Purificación de los derivados acetilados.

### 2.8.1.2. Acetilación enzimática

A una solución de ACG (1 mol) disuelto en 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se le agregó acetato de vinilo (1,2 moles por grupo OH a acetilar) y una cantidad de lipasa (*Candida antarctica* B) que puede variar entre un 10-30% (g lipasa/g compuesto a acetilar). La mezcla se colocó en un vial con tapa y se colocó en un agitador orbital a  $37^\circ\text{C}$  y 150-200 rpm durante varios días. La reacción fue monitoreada por CCF (Fig. 2.27) y una vez finalizada se filtró la lipasa, se lavó con el disolvente de reacción y se secó en evaporador rotatorio para su posterior purificación por CC.



**Figura 2.27.** Monitoreo de la reacción por CCF

Las lipasas se han empleado en la síntesis de una gran variedad de polímeros sintéticos, entre los que se encuentran algunos poliésteres y poliacrilamidas, a través de procedimientos en los que se explota la capacidad de esta enzima para catalizar sustituciones nucleofílicas sobre un grupo acilo. Las lipasas también han mostrado actividad catalítica en reacciones de adición de Michael. Es por ello que hemos intentado

sacar provecho de esta doble actividad catalítica, exhibida especialmente por la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B), comercialmente disponible como Novozym 435. Esta enzima posee gran estabilidad y capacidad para hidrolizar ésteres de alcoholes primarios.

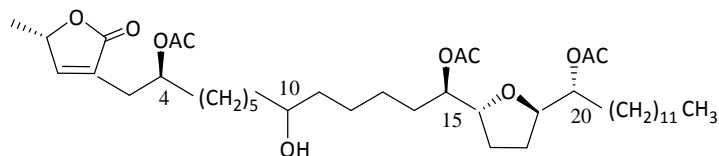
### 2.8.1.3. Identificación de las ACG acetiladas

La identificación de las ACG acetiladas química y enzimáticamente, tanto mono como bis-THF, fue lograda mediante comparación de datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN con los de las ACG naturales.

En  $^1\text{H}$ -RMN se observó que las señales de los protones correspondientes a los carbonos base hidroxilo se desplazaron a campos bajos ( 5,0-4,0 ppm) y desaparecieron las señales correspondientes a los protones de los grupos hidroxilos presentes en las ACG naturales. Asimismo, aparecieron nuevas señales singletes a campos altos correspondientes a los protones metílicos de los grupos acetato ( 2,2-2,0 ppm).

En  $^{13}\text{C}$ -RMN se observó que las señales correspondientes a los carbonos base hidroxilo se desplazan a campos bajos ( 75,0-71,0 ppm) y aparecieron nuevas señales a campos más bajos correspondientes a los carbonos cuaternarios del grupo acetato ( 171,0-170,0 ppm).



**2.8.1.3.1. ACG acetiladas químicamente****annonacin tri-acetilada**

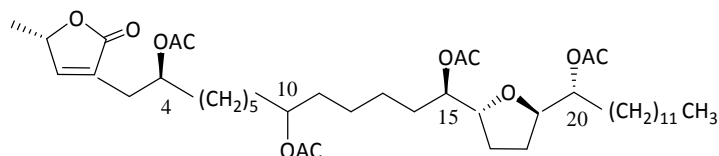
PM: 722

FM: C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>O<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm 0.89 (H-32), 1.42 (H-35), 2.04 (H-37), 2.09 (H-39; H-41), 3.88 (H-10), 3.96 (H-16, 19), 4.87 (H-15, 20), 5.11 (H-34), 7.10 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm 14.14 (C-32), 18.95 (C-35), 20.96 (C-37), 21.16 (C-39), 21.24 (C-41), 71.19 (C-10), 71.92 (C-4), 74.67 (C-15, 20), 77.58 (C-34), 79.29 (C-16, C-19), 130.18 (C-2), 150.95 (C-33), 170.69 (C-36), 170.73 (C-38), 170.96 (C-40), 173.53 (C-1).

Apéndice pág. 236-237.

**annonacin tetra-acetilada**

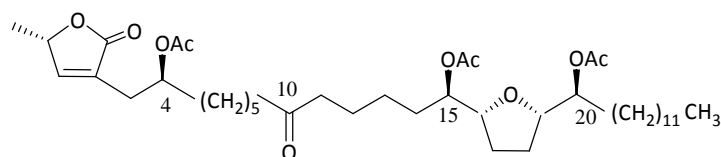
PM: 764

FM: C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>O<sub>11</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm 0.89 (H-32), 1.42 (H-35), 2.04 (H-41, 43), 2.09 (H-37, 39), 4.89 (H-15, 20; H-4), 3.97 (H-16, 19), 5.02 (H-10), 5.11 (H-34), 7.20 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm 14.14 (C-32), 18.94 (C-35), 20.16 (C-37), 21.18 (C-39), 21.25 (C-41), 21.29 (C-43), 71.87 (C-4), 74.06 (C-10), 74.86 (C-15, 20), 77.59 (C-34), 79.47 (C-16, 19), 130.16 (C-2), 150.98 (C-33), 170.69 (C-36), 170.95 (C-38), 170.97 (C-40, 42), 173.54 (C-1).

Apéndice pág. 238-239.

**cis-annonacin-10-one tri-acetilada**

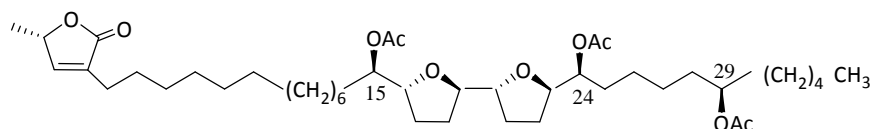
PM:720

FM: C<sub>41</sub>H<sub>68</sub>O<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 0,90 (H-32); 1,43 (H-35); 2,09 (H-37); 2,06 (H-39); 2,04 (H-41); 3,97 (H-16, 19); 4,87 (H-20); 4,99 (H-15); 5,04 (H-34); 5,11 (H-4); 7,10 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 14,14 (C-32); 18,95 (C-35); 20,96 (C-37); 21,16 (C-39); 21,25 (C-41); 70,83 (C-4); 71,86 (C-15); 74,96 (C-20); 75,42 (C-16); 77,59 (C-34); 79,59 (C-19); 130,02 (C-2); 150,13 (C-33); 170,62 (C-40); 170,68 (C-38); 170,73 (C-36); 173,53 (C-1); 216,66 (C-10).

Apéndice pág. 240-241.

**motrilin tri-acetilada**

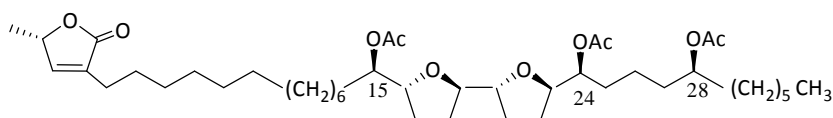
PM:748

FM: C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>O<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 3,90 (H-15); 4,01 (H-24); 3,99 (H-29); 2,04 (H-39); 2,09 (H-41); 2,06 (H-43).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 75,19 (C-15); 75,40 (C-24); 71,92 (C-29); 21,20 (C-39); 170,68 (C-38); 21,22 (C-40); 170,73 (C-41); 21,11 (C-43); 170,81 (C-42).

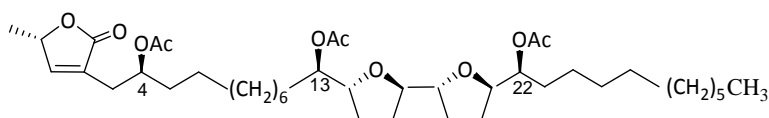
Apéndice pág. 242-243.

**squamocin tri-acetilada**

PM:748

FM: C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>O<sub>10</sub><sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 4,80 (H-15, 28); 4,90 (H-24); 2,10 (H-39, 41, 43).<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 73,50 (C-15, 28); 75,00 (C-24); 21,50 (C-39, 41, 43); 170,76 (C-38, 40); 170,80 (C-42).

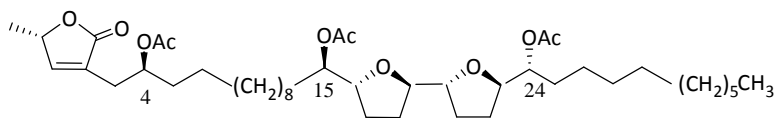
Apéndice pág. 244-245.

**molvizarin tri-acetilada**

PM:722

FM: C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>O<sub>10</sub><sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 5,11 (H-4); 4,94 (H-13); 4,85 (H-22); 2,09 (H-37); 2,19 (H-39, 41).<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 72,00 (C-4); 75,45 (C-13); 75,28 (C-22); 21,23 (C-37); 170,69 (C-36); 31,00 (C-39); 170,73 (C-38); 31,00 (C-41); 170,96 (C-40).

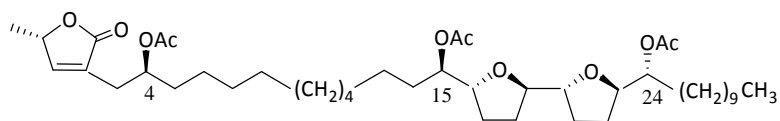
Apéndice pág. 246-247.

**asimicin tri-acetilada**

PM:748

FM: C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>O<sub>10</sub><sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 5,11 (H-4); 3,90 (H-15); 4,01 (H-24); 2,04 (H-39); 2,09 (H-41); 2,06 (H-43).<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 18,95 (C-39); 20,96 (C-41); 21,16 (C-43); 21,25 (C-41); 170,62 (C-38); 170,68 (C-40); 170,73 (C-42).

Apéndice pág. 248-249.

**rolliniastatin-2 tri-acetilada**

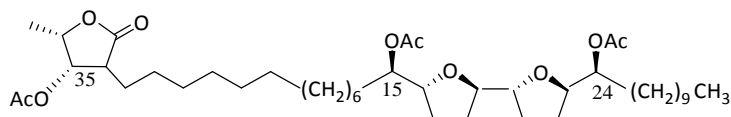
PM:748

FM: C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>O<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 0,88 (H-34); 1,41 (H-37); 2,03 (H-39); 2,05 (H-41); 2,08(H-43); 2,54(H-3); 3,89 (H-19, 20); 3,99 (H-16, 23); 4,87 (H-15); 4,92 (H-24); 5,01 (H-36); 5,10(H-4); 7,08(H-35).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 14,09 (C-34); 18,90(C-37); 21,11 (C-39); 21,20 (C-41); 21,22 (C-43); 71,92 (C-4); 75,19 (C-15); 75,40 (C-24); 77,52 (C-36); 80,02(C-23); 80,40 (C-19); 81,19 (C-20); 81,62 (C-16); 130,16(C-2); 150,86 (C-35); 170,66 (C-42); 170,69 (C-40); 170,98 (C-38); 173,50 (C-1).

Apéndice pág. 250-251.

**2.8.1.3.2. ACG acetiladas enzimáticamente****laherradurin tri-acetilada**

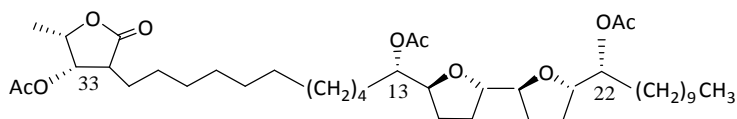
PM:750

FM: C<sub>43</sub>H<sub>74</sub>O<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 0,89 (H-34); 1,42 (H-37); 2,06 (H-41); 2,09 (H-43); 2,12 (H-39).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 18,03 (C-37); 20,80 (C-39); 21,25 (C-42); 21,27 (C-43); 75,17 (C-35); 170,33 (C-40); 170,75 (C-38); 171,04 (C-36).

Apéndice pág. 252-253.

**itrabin tri-acetilada**

PM:722

FM: C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>O<sub>10</sub>

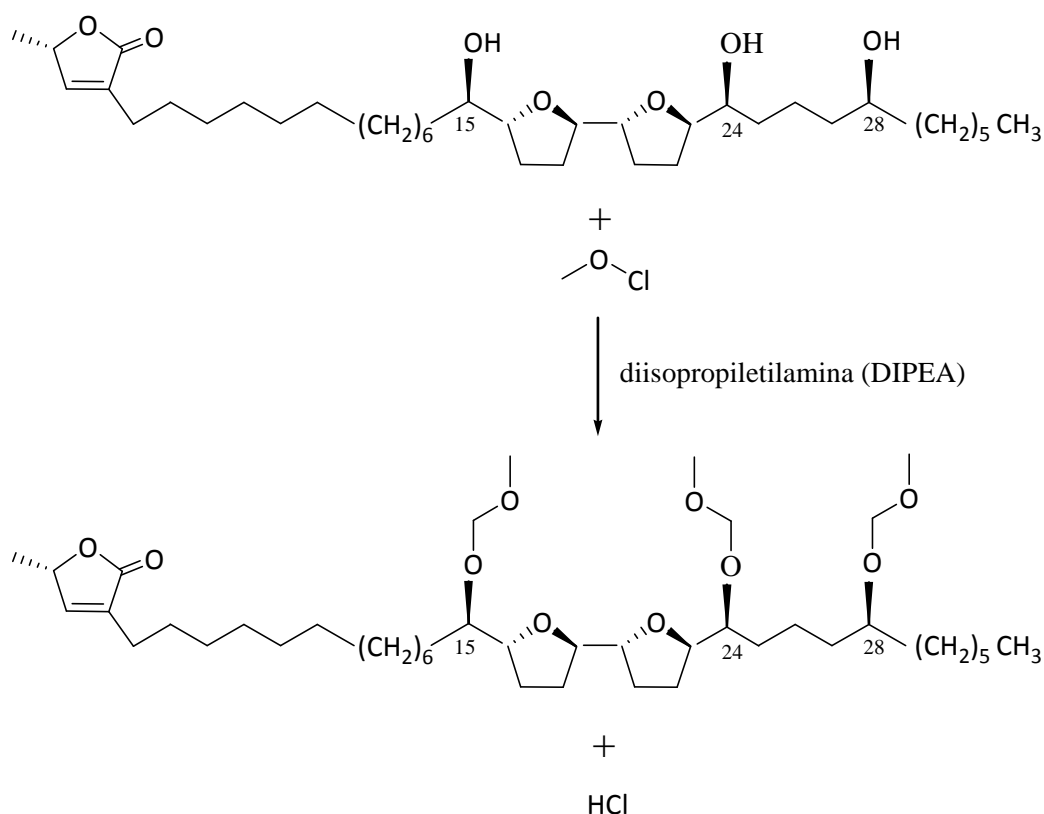
<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 0,89 (H-32); 1,42 (H-35); 2,06 (H-39); 2,09 (H-41); 2,12 (H-37); 3,91 (H-17, 18); 4,01 (H-14, 21); 4,52 (H-34); 4,89 (H-13); 4,93 (H-22); 5,10 (H-33).

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 14,14 (C-32); 18,03 (C-35); 20,80 (C-37); 21,25 (C-40); 21,27 (C-41); 75,17 (C-33); 75,24 (C-13); 75,45 (C-22); 80,30 (C-21); 80,47 (C-14); 81,26 (C-18); 81,68 (C-17); 170,33 (C-40); 170,75 (C-38); 171,04 (C-36); 176,40 (C-1).

Apéndice pág. 254-255.

### 2.8.2. Metoximetilación de las ACG naturales

A una solución de la ACG (14 mg, 0,031mmol) en 0,3 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bajo  $\text{N}_2$ , se le agregaron 17  $\mu\text{L}$ , (0,098 mmol) de DIPEA (diisopropiletilamina) y 6  $\mu\text{L}$  de cloruro de metoximetilo (MOMCl). (Fig. 2.28) La reacción se siguió por CCF hasta la formación de los productos, luego se agregaron 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavó con solución saturada de  $\text{CuSO}_4$  y solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . La fase orgánica se lavó con solución saturada de  $\text{NaCl}$ , se secó y se evaporó al vacío para dar un crudo que se cromatografió por CC.



**Figura 2.28.** Ecuación química general de metoximetilación.

#### 2.8.2.1. Identificación de los derivados metoximetilados (MOM)

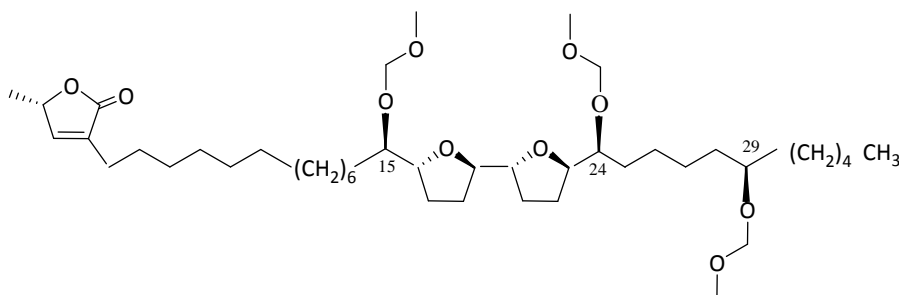
La identificación de las ACG bis-THF metoximetiladas, motrilin, squamocin y rolliniastatin-2 (MOM), fue lograda mediante comparación de los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN con los de las ACG naturales.

En  $^1\text{H}$ -RMN se observó que las señales de los protones correspondientes a los carbonos base hidroxilo que se encontraban a 4,2-4,5 ppm se desplazaron a 3,9 ppm y

desaparecieron las señales correspondientes a los protones de los grupos hidroxilos presentes en la ACG original. Asimismo, aparecieron nuevas señales singletes entre 3,3-3,5 ppm y 4,6-4,9 ppm, correspondientes a los protones metílicos y metilénicos del grupo metoximetil respectivamente.

En  $^{13}\text{C}$ -RMN se observó que las señales correspondientes a los carbonos base hidroxilo que se encontraban entre 71,3-74,2 ppm, se desplazaron a campos más bajos hacia 79,0-81,8 ppm y aparecieron nuevas señales a 55,0-56,0 y 96,0-97,0 ppm, correspondientes a los carbonos metílicos y metilénicos del grupo metoximetil, respectivamente.

#### motrilin tri-metoximetilada



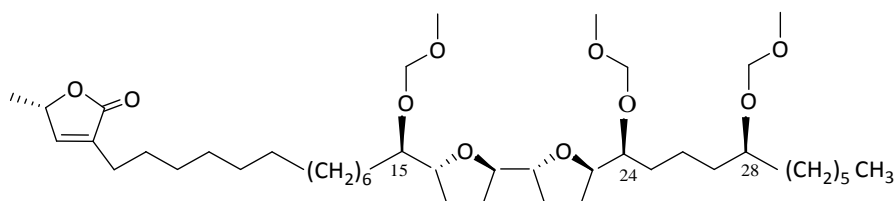
PM:754

FM:  $\text{C}_{43}\text{H}_{78}\text{O}_{10}$

$^1\text{H}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 3,39 (H-15); 3,88 (H-24); 3,60 (H-29); 4,65(H-38); 3,37 (H-39); 4,69 (H-40); 3,37 (H-41); 4,74(H-42); 3,39 (H-43)

$^{13}\text{C}$ -RMN: ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) ppm: 74,08 (C-15); 71,23 (C-24); 71,43 (C-29); 55,33 (C-39, 41); 96,79 (C-38); 96,70 (C-40); 55,73 (C-43); 96,17 (C-42)

Apéndice pág. 256-257.

**squamocin tri-metoximetilada**

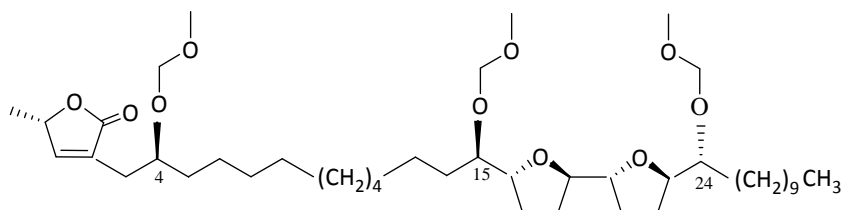
PM:754

FM: C<sub>43</sub>H<sub>78</sub>O<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 43,90 (H-15, 24); 3,40 (H-28); 4.70 (H-38, 40, 42); 3.50 (H-39, 41, 43)

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 74,08 (C-15); 71,23 (C-24); 71,43 (C-28); 55,71 (C-39); 96,82 (C-38); 56,67 (C-41); 96,73 (C-39); 55,73 (C-43); 96,13 (C-42)

Apéndice pág. 258-259.

**rolliniastatin-2 tri-metoximetilada**

PM:754

FM: C<sub>43</sub>H<sub>78</sub>O<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 43,90 (H-15, 24); 5,01 (H-4); 4.70 (H-38, 40, 42); 3.50 (H-39, 41, 43)

<sup>13</sup>C-RMN: (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) ppm: 74,05 (C-15); 71,19 (C-24); 71,03 (C-4); 55,71 (C-39); 96,82 (C-38); 56,67 (C-41); 96,73 (C-39); 55,73 (C-43); 96,13 (C-42)

Apéndice pág. 260-261.



### 3. Actividad biológica de las ACG

Las ACG de Annonaceae son potentes compuestos citotóxicos conocidos por su acción insecticida, parasiticida, fungicida, herbicida y sobre todo, por su acción antitumoral (Zafra-Polo y col., 1996; Rupprecht y col., 1990; Myint y col., 1991; Cortes y col., 1993; Fang y col., 1993), siendo capaces de inhibir el crecimiento de diversos tipos de líneas celulares tumorales. En 1991, Londerhausen y col., estudiaron el mecanismo de acción molecular de las ACG, estableciendo que estos compuestos actúan como potentes inhibidores del complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos resultados fueron confirmados poco después por otros grupos de investigación (Ahammaadsahib y col., 1993; Lewis y col., 1993).

El complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es el mayor y más complicado de los complejos enzimáticos implicados en los procesos bioenergéticos de la membrana mitocondrial interna. Su función es la reoxidación del NADH formado en la matriz mitocondrial por las vías catabólicas oxidativas canalizando los equivalentes de reducción hacia la ubiquinona o coenzima Q de la membrana mitocondrial interna, proceso durante el cual parte de la energía se conserva mediante la generación de un gradiente electroquímico en el espacio intermembranas a través del movimiento vectorial de protones. La energía de este gradiente electroquímico, al cual contribuyen también los complejos enzimáticos III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa) y IV (citocromo c oxidasa), es utilizada por la ATPasa mitocondrial para sintetizar ATP, proceso conocido como fosforilación oxidativa (Weiss y col., 1991). Aproximadamente, 2/3 del ATP generado en las células durante el catabolismo aeróbico es producido a partir de la reoxidación del NADH intramitocondrial, lo que requiere la participación directa del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. De la enorme trascendencia que tiene este complejo enzimático para el mantenimiento de la función bioenergética celular se desprenden las graves consecuencias metabólicas que su inhibición ocasiona.

Adicionalmente, se ha descrito, al menos para algunas ACG, la capacidad de inhibición del sistema NADH oxidasa de la membrana plasmática de células tumorales (Morré y col., 1995); sin embargo la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria y la consecuente disminución de la producción mitocondrial de ATP es razón más que

suficiente para explicar la potente actividad citotóxica de estos compuestos, cuyo efecto dependerá, en principio de los requerimientos de energía de cada estirpe celular, siendo lógicamente, más susceptibles los tipos celulares que mayor dependencia tengan de la fosforilación oxidativa.

Además, las ACG tienen una gran facilidad para formar complejos con cationes metálicos, especialmente con iones hierro y calcio, lo cual se ha demostrado por estudios de RMN (Sasaki y col., 1995; Peyrat y col., 1997). La configuración relativa de las ACG es un factor importante para la formación de estos complejos. Puesto que el complejo I de la cadena respiratoria presenta varios grupos prostéticos de naturaleza ferrosulfurada con función de oxidorreducción, algunos autores han sugerido que la acción inhibidora de las ACG podría deberse a una interacción directa con estos grupos prostéticos formando complejos que bloquearían su función (Shimada y col., 1998); sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser demostrada experimentalmente. También se ha sugerido que la formación de complejos con el ion  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual juega un importante papel como efector metabólico, podría alterar considerablemente las funciones celulares, pero tampoco existen evidencias experimentales de este posible mecanismo.

### **3.1. Acción Insecticida**

La complejidad y peculiaridad del metabolismo secundario de las plantas genera en muchas especies un reservorio de sustancias de interés potencial. En el mundo cerca de 1.800 especies, se emplearon en la medicina tradicional, 30.000 especies de plantas han sido investigadas de acuerdo al criterio científico por alguna acción biológica o por la presencia de metabolitos secundarios (Wolfgang y col., 2012). Sin embargo, el número de especies de plantas es mucho mayor, 500.000 a 700.000.

Se estima que los metabolitos secundarios son empleados como estrategia defensiva de las plantas para establecer su territorio, contra infecciones y también contra la herbivoría. Algunos metabolitos pueden actuar como estimulantes o inhibidores de la alimentación, como estimulantes o inhibidores de la ovoposición y muchos de ellos son tóxicos produciendo alteraciones en alguna etapa del desarrollo del insecto. Actualmente la acción está focalizada no sólo en determinar la estructura y actividad biológica de los

metabolitos secundarios sino también relacionar la estructura con la actividad y encontrar el mecanismo de acción.

Las investigaciones en este campo deben incrementarse ya que el control integrado de plagas recomienda la utilización de productos naturales con actividad insecticida como agente de control. Asimismo, es una alternativa válida para minimizar la utilización de productos químicos sintetizados altamente tóxicos y contaminantes del medio ambiente.

Existen numerosos ensayos para investigar la actividad insecticida, particularmente sobre especies de considerable importancia económica.

### 3.2. Interés fitosanitario

Las numerosas evidencias de que nuevos insecticidas y acaricidas actúan mediante una inhibición selectiva de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial ha proporcionado las bases para el desarrollo de una nueva generación de agentes de lucha contra las plagas agrarias (Cavé y col., 1997; Miyoshi, 1998). Así, recientemente se han presentado al mercado nuevos productos con este mecanismo de acción, mucho más efectivos y seguros que los productos anteriormente utilizados. Sobre todo, destacan la fenazaquiba, comercializado con el nombre de "Magister" por Dow Elanco, el pyridaben (Nissan Chemical), el fenpyroximato (Nihon Nohyaku) y el SAN 548A (Sandoz-Novartis), todos ellos adecuados para luchar contra diversos insectos presentes en nuestros campos. Tanto el mejor conocimiento del modo de acción de estos potentes compuestos como el desarrollo de métodos sintéticos que permitan su fácil obtención puede proporcionar una valiosa vía para su explotación comercial como plaguicidas selectivos.

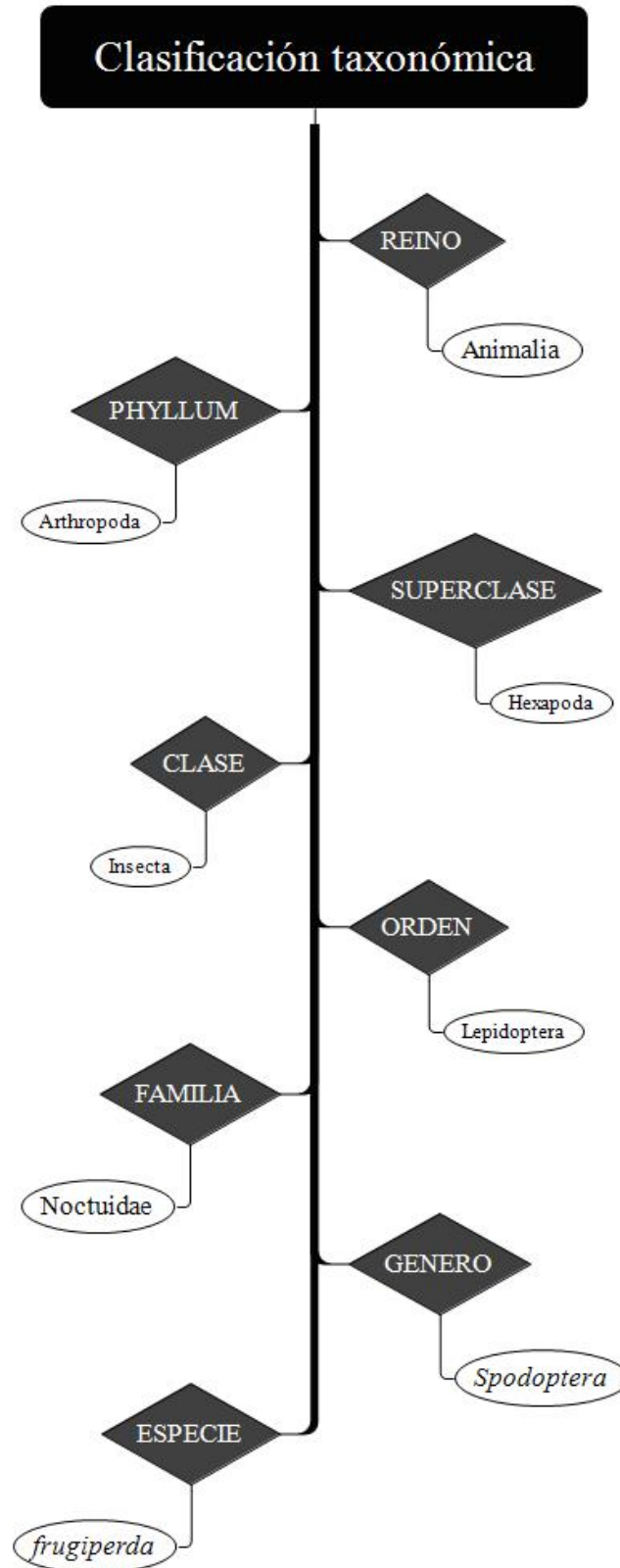
Los efectos tóxicos de las ACG han sido reportados para varias especies de plagas de insectos (Alali y col., 1999). Trabajos realizados previamente (He y col., 1997) indican que las acetogeninas que poseen anillos bis-THF con tres grupos hidroxilos poseen un potente efecto insecticida sobre las larvas de mosquito de la fiebre amarilla en ensayos por contacto. En particular, squamocin, una bis-THF ACG con tres grupos hidroxilo, tiene acción ovicida y larvicida sobre especies de *Drosophila* (Kawasu y col., 1989), así como

efectos insecticidas sobre *Leptinotarsa decemlineata* y *Myzus persicae* (Guadaño y col., 2000). Las ACG, bis-THF con tres grupos hidroxilos, parviflorin y asimicin (Alali y col., 1999) resultaron tóxicas para una especie de cucaracha alemana, afectando su desarrollo ninfal.

Además, se evaluaron los efectos tóxicos y antialimentarios que producen las ACG cuando se incorporan a la dieta artificial de larvas de *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae* (Guadaño y col., 2000), *S. frugiperda* y *Oncopeltus fasciatus* (Álvarez Colom y col., 2007, 2008). Se eligió realizar los estudios sobre el lepidóptero generalista *Spodoptera frugiperda*, considerada plaga clave del maíz en el norte argentino; conocida como “oruga militar tardía o gusano cogollero”.

### 3.2.1. *Spodoptera frugiperda*

A continuación, se describe la clasificación taxonómica de la *Spodoptera frugiperda*.



La *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) es un insecto del orden Lepidoptera que presenta generalmente seis estadios larvales que es cuando produce graves daños en los cultivos (Sparks, 1979; Capinera, 1999). Se le conoce comúnmente como gusano cogollero y es una de las principales plagas en sembradíos de maíz donde se alimenta de hojas y tallos tiernos (Marengo y col., 1992; Kumar y Mihm, 2002). Este insecto es nativo de América y se distribuye desde los Estados Unidos hasta Argentina.

El ciclo de vida de este insecto consta de 4 etapas que son: huevo, larva, pupa y adulto. Las larvas son activas de noche y de día, atacan a la planta de maíz según el momento de su desarrollo actuando como cortadoras, defoliadoras y cogolleras y producen daños directos cuando se alimentan de los granos de la espiga (Willink y col., 1993).

En el estadio larval el insecto muda varias veces (6-8 estadios) como consecuencia de cambios hormonales, lo cual produce variación en el tamaño, comportamiento y morfología. Durante los dos primeros estadios, las larvas roen la epidermis de las hojas, dejando manchas translúcidas; a partir del tercer estadio, consumen toda la lámina foliar dejando huecos irregulares en el follaje, luego migran hacia el cogollo, donde encuentran protección. Por otra parte, a esa edad tienen hábitos caníbales, razón por la cual se encuentra una sola por cogollo. El mayor consumo, 80% de la ingesta, lo realizan en los dos últimos estadios, pudiendo destruir totalmente el cogollo (Alonso Álvarez, 1991; Murillo, 1991). Otro aspecto interesante de su comportamiento, en relación con la disponibilidad de territorio, es la migración que muestran las larvas a partir del 2° estadio, con el fin de buscar nuevas plantas.

El gusano cogollero se alimenta durante el día y la noche, pero es generalmente más activo en la mañana o en la tarde. Causa serios daños al consumir las hojas, se alimenta de las inflorescencias sin desarrollar, causa daño directo a la mazorca, y las larvas pueden barrenar dentro de los tallos. Varía en color desde canela claro hasta verde o negro. Tres líneas amarillentas corren desde la cabeza hasta la cola. En cada lado tienen una banda oscura y una banda amplia amarilla con manchas. Sobre la cabeza tiene una marca en forma de Y invertida (Fig. 3.1.). Las larvas crecen hasta de 30 a 40 mm de longitud. La pupa mide entre 14 y 17 mm de longitud. Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo, tiene un color caoba que se oscurece conforme madura. Las mariposas son de coloración gris oscura, las hembras tienen alas traseras de color blanco, mientras que

los machos figuras irregulares llamativas en las alas delanteras, y las traseras son blancas. Permanecen escondidos entre las malezas, o en otros sitios sombreados durante el día y son activos al atardecer o durante la noche cuando son capaces de desplazarse a varios kilómetros de distancia; prefieren oviponer en las hojas del maíz menos dañadas por larvas de su misma especie (Alonso Álvarez, 1991). Con una o más posturas en pocas plantas logra fácilmente una infestación generalizada en lotes cuando eclosionan las larvas (Murillo, 1991).



**Figura 3.1.** Larvas de *Spodoptera frugiperda*.

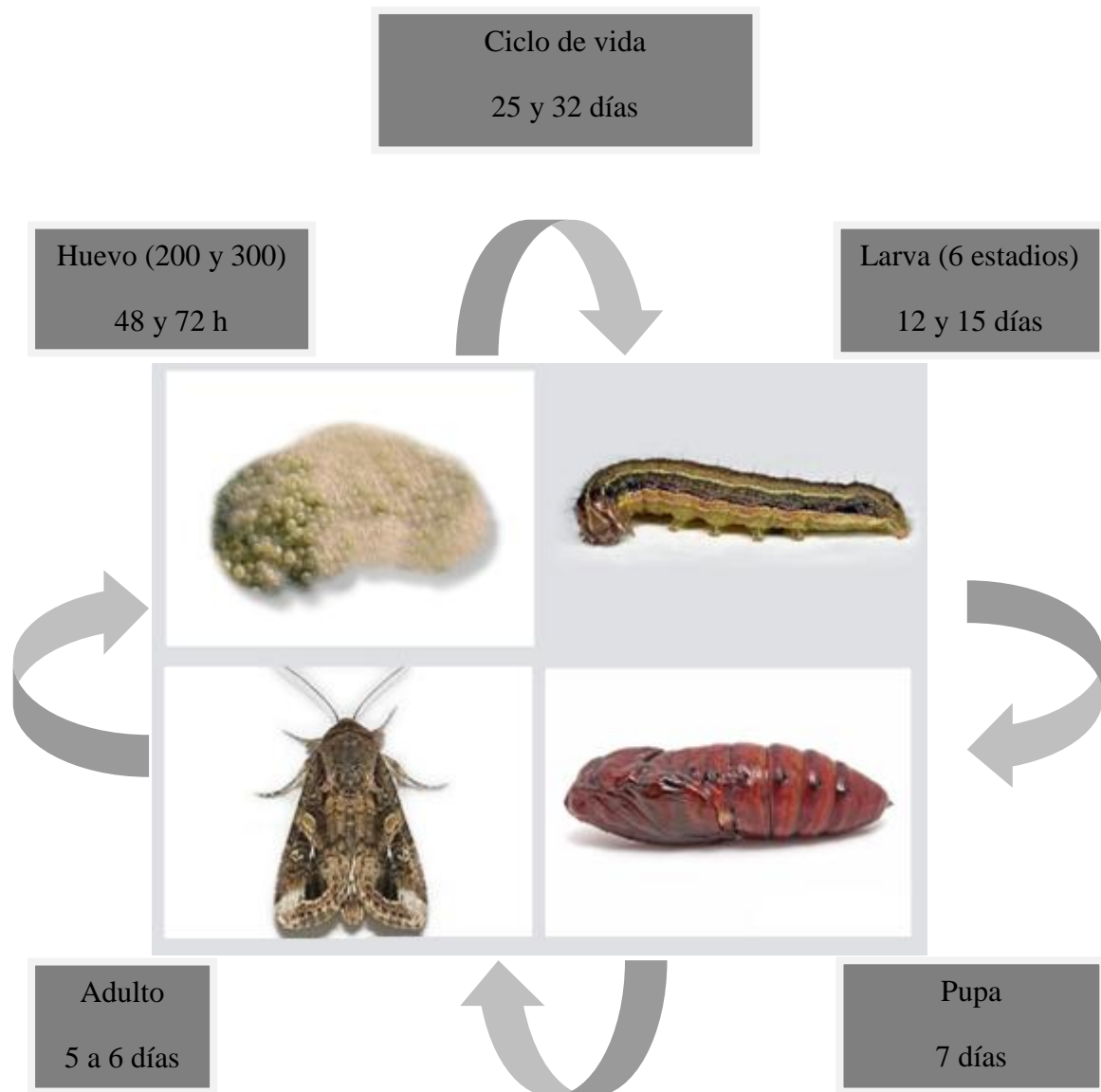
Las larvas de *S. frugiperda* se obtuvieron de huevos provenientes de crías mantenidas en la cátedra de Química Orgánica III de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, a través de numerosas generaciones sin exposición a ningún plaguicida. El ciclo de vida del insecto en la naturaleza oscila entre 25 y 32 días (Fig. 3.2.).

**Huevo:** Las hembras ponen entre 200 y 300 durante 5 a 6 días, son de color rosado pálido, se torna gris a medida que se aproxima la eclosión. La larva emerge entre 48 y 72 horas.

**Larva:** Permanece en este estado entre 12 y 15 días.

**Pupa:** 7 días.

**Adulto:** 12 a 14 días. En pre-oviposición puede migrar varios kilómetros.



**Figura 3.2.** Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*.



El lepidótero, *Spodoptera frugiperda*, ataca al maíz con niveles variables en las regiones tropicales y subtropicales de América Latina, constituyendo un factor limitante del cultivo (Clavijo y Pérez Greiner, 2000; Molina Ochoa y col., 2003). En Argentina, fue declarada "Plaga Nacional" en 1988, siendo objeto de varias contribuciones científicas referidas a diversos aspectos de su biología en laboratorio (Valverde y col., 1995; Murúa y col., 2003; Murúa y Virla, 2004) y a los niveles de daño ocasionados al cultivo de maíz (Willink y col., 1993; Sosa, 2002 a,c). Sin embargo, a pesar de su peligrosidad, el comportamiento invernal de sus poblaciones es aún desconocido. El único estudio que se refiere a la fluctuación poblacional de la plaga fue realizado mediante el empleo de trampas de luz en el norte de la Provincia de Santa Fe (Sosa, 2002 b). De manera general, el daño puede manifestarse en la forma de raspado e ingestión de la epidermis superior y del mesófilo de las hojas (Fig. 3.3.), muy evidente cuando se presenta en plantas jóvenes, ocasionado por larvas de tamaño pequeño, dejando sólo la epidermis inferior, la cual mientras permanece, le confiere una apariencia traslúcida y que, al caerse, deja en la superficie de las hojas unas pequeñas "ventanas" de forma irregular. El daño es visualmente impactante, sobre todo en el caso de ataques por parte de poblaciones altas del insecto, pero de escasa o ninguna significación económica. Otro tipo de daño lo representa el corte de plantas jóvenes a nivel de la base del tallo, generando la pérdida irremediable de la planta. La importancia económica del daño tiene relación directa con la población del insecto presente y tendría que ser inusualmente alta para representar alguna significación (Notz y Clavijo, 1981).

En algunas circunstancias, inducidas por factores aún desconocidos, el insecto adquiere un comportamiento gregario, que lo impulsa a desplazarse en grandes grupos de larvas, las cuales, investidas de una gran voracidad, consumen a su paso casi todo tipo de vegetación, por lo que se le da a esta fase la denominación de "barredor" y que, al encontrarse en una siembra de maíz, pueden llegar a causar serios destrozos. Un ataque como el descrito puede ser mejor resistido por el maíz si se encuentra acompañado por malezas en el campo, las cuales, por ser usualmente más jóvenes que el cultivo, tienden a ser preferidas por el insecto. La forma de daño más tradicional, tiene que ver con la migración de las larvas desde el lugar donde ocurrió la oviposición hacia la zona de la yema apical o "cogollo". En ese lugar se aloja usualmente más de una larva, de diferente tamaño, conviviendo y escondidas entre los pliegues de las hojas que están por brotar, alimentándose de ellas, e inclusive de la panoja antes que ésta emerja. Además del maíz,

*S. frugiperda* ataca a otros cultivos: arroz, sorgo, soja, pastos, pimentón, tomate, berenjena (Anzola, 2000; Alonso Álvarez, 1991; Pastrana y Hernández, 1979; Fernández, 1991; Murillo, 1991), produciendo mayores daños durante los dos últimos estadios larvales.



Figura 3.3. Daño producido por *S. frugiperda* en el mesófilo de la hoja.

### 3.2.2. Tipos de daños

) **Esqueletización de las hojas:** Este daño, caracterizado por el raspado de la superficie de la hoja, afecta sólo un lado de la misma y es producido por las larvas al alimentarse durante los dos primeros estadios.

) **Daño como cortador:** Las larvas cortan las plantas en la base del tallo durante los primeros 15 días después de la emergencia de las plántulas.

) **Daño como barredor:** Se presenta cuando las larvas alcanzan altos niveles poblacionales, alimentándose de todo el tejido foliar, dejando únicamente la nervadura central. Esta forma de ataque es la más dañina ya que invade en grandes cantidades las siembras jóvenes, destruyendo completamente el cultivo.

) **Daño como cogollero:** Las larvas generalmente viven protegidas dentro del cogollo en número no mayor de 2 larvas/planta, alimentándose del tejido tierno. En ocasiones puede también destrozar la panoja antes de su emergencia. Este daño es producido una vez que la planta tiene cuatro o más hojas y está caracterizado por la generación de agujeros de tamaño y forma irregular en la lámina foliar, observables después que la hoja abre.

) **Daño a mazorcas:** Las larvas pueden destruir los granos en cualquier parte de las mazorcas tiernas, a diferencia de *Heliothis zea* (Boddie), que tiene preferencia por la parte apical.

J **Daño a panojas:** Algunas veces las larvas se alimentan de las panojas tiernas del maíz recién salida.

Existen dos biotipos de *S. frugiperda* que han sido identificados por sus preferencias de planta hospedera. El biotipo arroz se ha asociado con arroz y pastos, mientras que el biotipo maíz predomina en maíz y algodón (Virla y col., 2008). El término biotipo se refiere a una población con alguna diferenciación genética o fenotípica con respecto a otra población, la cual está en el mismo rango polimórfico de lo que taxonómicamente se define como especie.

Los biotipos son casi idénticos morfológicamente, mostrando diferencias significativas en la preferencia de hospederos, su fisiología, comportamiento de apareamiento y susceptibilidad a insecticidas (Virla y col., 2008).

A lo largo de la evolución, tanto las plantas como los insectos han ido adaptándose a las presiones ambientales a las que han estado sometidos. Así, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos por los cuales, por un lado, atraen a insectos que son beneficiosos para ellas y por otro, se defienden del ataque de insectos fitófagos. Por su parte, los insectos han desarrollado estrategias para evadir las defensas generadas por las plantas, creándose así un equilibrio dinámico entre plantas e insectos (Harborne, 1982).

Como resultado de la coevolución entre plantas e insectos, las plantas han desarrollado una inmensa variedad de mecanismos de defensa, que pueden ser de tipo físico o químico, gracias a los cuales adquieren una serie de ventajas adaptativas (Boulter, 1993). Los mecanismos de tipo físico, son aquellos que implican una modificación morfológica en la planta, que supone una barrera al insecto en su intento de acceso a ésta. Estas modificaciones se observan en las plantas como espinas, tricomas, ceras, etc. (Deverall, 1979). Las defensas de tipo químico pueden ser directas en forma de sustancias tóxicas, disuasorias, repelentes y reductoras de la digestibilidad (Cornell y Hawkins, 2003), o indirectas mediante sustancias volátiles que atraen a los enemigos naturales (depredadores y parasitoides) de los insectos que atacan a la planta (Turlings y col., 1995). Whittaker y Feeny (1971), propusieron el término de compuestos aleloquímicos para referirse a sustancias no nutricionales producidas por individuos de una especie y que afecta el comportamiento, desarrollo o la biología de individuos de otras especies. Estos

compuestos químicos son denominados también metabolitos secundarios, ya que no están implicados directamente en los procesos metabólicos primarios o de crecimiento y desarrollo de la planta, pero tienen una función ecológica importante, como defensas químicas contra microorganismos, insectos, otros herbívoros e incluso contra otras plantas (Balandrin y col., 1985; Feeney, 1992; Berenbaum y Rosenthal, 1992). La importancia de los metabolitos secundarios en las interacciones planta-insecto es muy conocida, pudiendo actuar de forma constitutiva o inducible como atrayentes, repelentes, estimulantes o inhibidores de la alimentación o de la oviposición, como sustancias tóxicas y como reguladores del desarrollo (Jacobson, 1989; Ascher, 1993).

Se han identificado más de 100.000 metabolitos secundarios en plantas (Dixon, 2001). Sin embargo, se considera que el potencial que ofrece el reino vegetal como fuente de compuestos potencialmente útiles no ha sido suficientemente aprovechado, ya que sólo un limitado porcentaje de las 270.000 especies de plantas superiores conocidas han sido investigadas en cuanto a sus compuestos activos y es frecuente el caso en que las plantas son investigadas solamente por un tipo específico de actividad biológica (Balandrin y col., 1985).

Los mecanismos de defensa química que las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución tienen un gran potencial para el desarrollo de métodos más racionales de control de plagas, ya sea como protectores naturales de las plantas o como modelos para el desarrollo de productos sintéticos (Murray y col., 1999; Álvarez Colom y col., 2005, 2007 y 2008).

### **3.3. Búsqueda de insecticidas naturales. Importancia**

Ante la problemática causada por la utilización de productos químicos sintéticos altamente tóxicos y contaminantes del medio ambiente, es necesario hallar nuevas alternativas ecológicas de control de insectos. Una de ellas sería el uso de productos naturales que, siendo parte del ecosistema, sería mucho más compatible y menos tóxico para el ambiente. Esta búsqueda se ve sustentada en el hecho de que las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa como resultado de la exposición milenaria a patógenos y predadores. La selección de plantas que contengan productos

naturales capaces de ser utilizados como insecticidas debe ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción.

Existen tres familias de plantas que llaman la atención como prometedoras fuentes de compuestos insecticidas son: Annonaceae, Solanaceae y Meliaceae (Castillo-Sánchez y col., 2010). Estas familias han sido seleccionados para ser estudiados por las siguientes razones:

- 1) Poseen diferentes grupos químicos para controlarlos insectos
- 2) Son familias comunes en los trópicos y se cultivan en diversas regiones
- 3) Hay investigaciones que han demostrado actividad biológica contra insectos y se destacan como plantas potenciales para su uso en la zona tropical.

La familia de las anonáceas ha atraído mucha atención desde los años 80, debido a la presencia de ACG, cuyas características estructurales presentan una variedad de actividades biológicas, donde destaca la actividad insecticida (Ocampo y Ocampo, 2006). En el género *Annona*, se destacan dos especies por sus propiedades insecticidas, *A. muricata* y *A. squamosa*.

Las ACG se encuentran en hojas, ramas y principalmente en semillas de los frutos de anonáceas. Los solventes utilizados para la extracción de ACG son variados como: etanol (Bobadilla y col., 2002), acetona (Khalequzzaman y Sultana, 2006), cloroformo (Parvin y col., 2003), éter de petróleo (Álvarez Colom y col., 2008), hexano (Fontana y col., 1998), así como también, diclorometano, dimetilsulfóxido y Tween 20® (Castillo-Sánchez y col., 2010), entre otros. El criterio para elegir el disolvente está centrado en el menor efecto negativo sobre el estudio, obteniéndose así, adecuados extractos de plantas o metabolitos secundarios para evaluación.

### **3.4. Metodología de los bioensayos**

#### **3.4.1. Mantenimiento de la cría de *Spodoptera frugiperda*. Dieta artificial**

La colonia de *S. frugiperda* es mantenida en nuestro laboratorio. Se inició con larvas obtenidas de plantaciones de maíz infestadas de nuestra provincia. Las larvas fueron alimentadas con una dieta artificial preparada con una mezcla de porotos molidos (224

g), levadura de cerveza (45 g), germen de trigo (52 g), agar-agar (60 g), ácido sórbico (1,5 g), ácido ascórbico (9 g), nipagin (3 g), formaldehído 10 % (3 mL) como conservantes y agua (1500 mL). La cámara de cría es mantenida a  $25\pm 1$  °C,  $50\pm 5\%$  de humedad relativa (HR) y fotoperiodo de 10 horas luz (HL).

### 3.5. Diseño del Bioensayo en laboratorio

#### 3.5.1. Formulaciones

Las formulaciones estudiadas se prepararon por adición a la dieta larval artificial control de:

- 100 y 250  $\mu\text{g/g}$  en acetona de los 3 subextractos.
- 100  $\mu\text{g/g}$  en acetona de las ACG naturales y semisintéticas.

Una vez preparada la dieta artificial para *S. frugiperda*, se adicionan a distintas porciones los compuestos a estudiar disueltos en acetona (dieta tratada) y sólo acetona (dieta control). Se evapora el solvente en desecador.

### 3.6. Evaluación de la actividad antialimentaria, efectos nutricionales y toxicidad

Se colocan 125 mg tanto de dieta control como de dieta tratada en tubos de ensayos. En cada tubo se coloca una larva de tercer estadio, previamente pesada. Los tubos se mantienen en cámara de cría a  $25\pm 1$  °C,  $50\pm 5\%$  de humedad relativa (HR) y fotoperiodo de 10 h luz, hasta la emergencia de la primera generación de adultos. Se realizan 20 repeticiones para el control y 20 repeticiones para el tratado.

Cuando el 50% del control come el 50% de la dieta, se calcula el  $FR_{50} = \text{Peso dieta Tratada} / \text{Peso dieta Control}$ . En general esto ocurre a las 48 h de iniciado el experimento. Este resultado permite conocer la conducta del insecto frente a la dieta, es decir la **actividad antialimentaria**.

Al cabo de 10 días se pesan nuevamente las larvas y con la dieta consumida en ese período se calculan los **índices nutricionales**:

**Índice de consumo de dieta (CI):**

Promedio de dieta ingerida durante el experimento.

$$CI = D / t$$

**Índice de crecimiento (GR):**

Promedio diario del peso ganado en el periodo que dura el experimento.

$$GR = (A - B) / t$$

**Índice de eficacia del consumo (ECI):**

Razón entre el peso ganado y el alimento consumido durante el ensayo.

$$ECI = (A - B) / D$$

Donde:

D = Peso de dieta ingerida durante el experimento

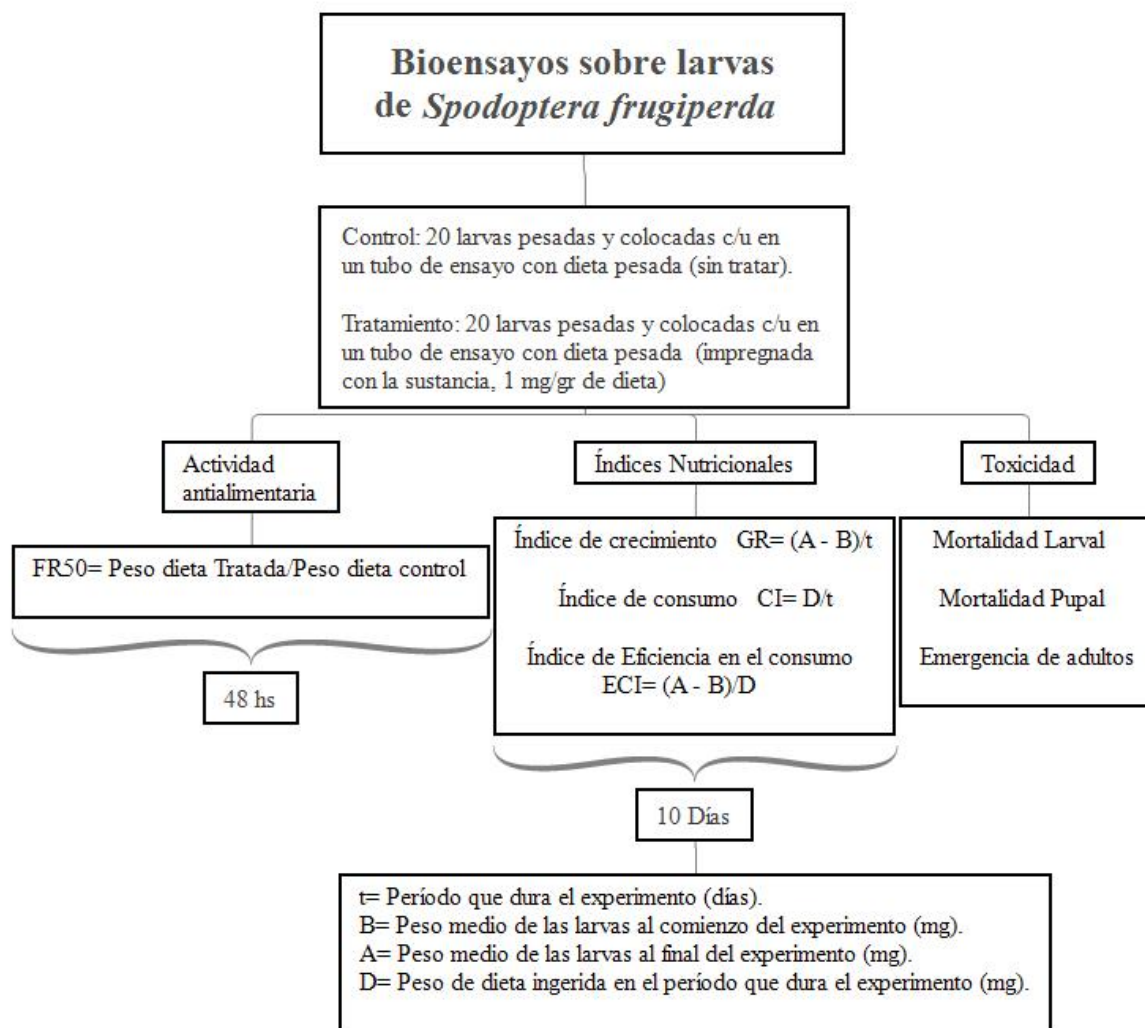
B = Peso larval inicial

A = Peso larval final

t = Período que dura el experimento

Para determinar la **toxicidad**, se continúa alimentando a las larvas, tanto tratadas como control y se evalúa la mortalidad larval, pupal y la emergencia de la primera generación de adultos. La mortalidad larval es considerada como un efecto letal, ya que ocurre durante el tratamiento con el compuesto a evaluar. Los otros efectos, como es el caso de la mortalidad pupal, se considera un efecto subletal, por tener lugar luego de haberse completado el tratamiento con la dieta tratada.

Se esquematiza en el siguiente cuadro la metodología empleada, en los bioensayos de laboratorio.



### 3.7. Bioensayo a semicampo

Los resultados de los bioensayos en laboratorio indicaron que en las especies que estudiamos de la familia Annonaceae están presentes ACG con capacidad de control del lepidóptero *S. frugiperda*. Sin embargo, debe considerarse que la respuesta obtenida es específica para el insecto estudiado y para las dosis utilizadas. Se hace necesario realizar más evaluaciones en la pequeña o mediana escala, que simulen condiciones de campo, donde la eficacia real pueda ser verificada para los compuestos que presentaron su mayor bioactividad bajo las condiciones de laboratorio.

Las larvas de *S. frugiperda* que se emplean en los bioensayos son provenientes de crías mantenidas en la cátedra de Química Orgánica III de la Facultad de Bioquímica, Química



y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, a través de numerosas generaciones sin exposición a ningún plaguicida (pág. 91).

Se eligieron semillas “maíz Leales 25”, por su adaptabilidad a los climas subtropicales, reinantes en el norte y centro del país. Las semillas fueron donadas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Famaillá-Tucumán.

### 3.7.1. *Zea Mays*

El maíz (*Zea Mays*) es una planta gramínea anual, originaria de México, introducida en Europa durante el siglo XVI, después de la invasión española. Actualmente, es el cereal de mayor producción en el mundo, por encima del trigo y el arroz. El maíz se extendió al resto del mundo, debido a su capacidad de crecer en climas diversos (Fig. 3.4.).



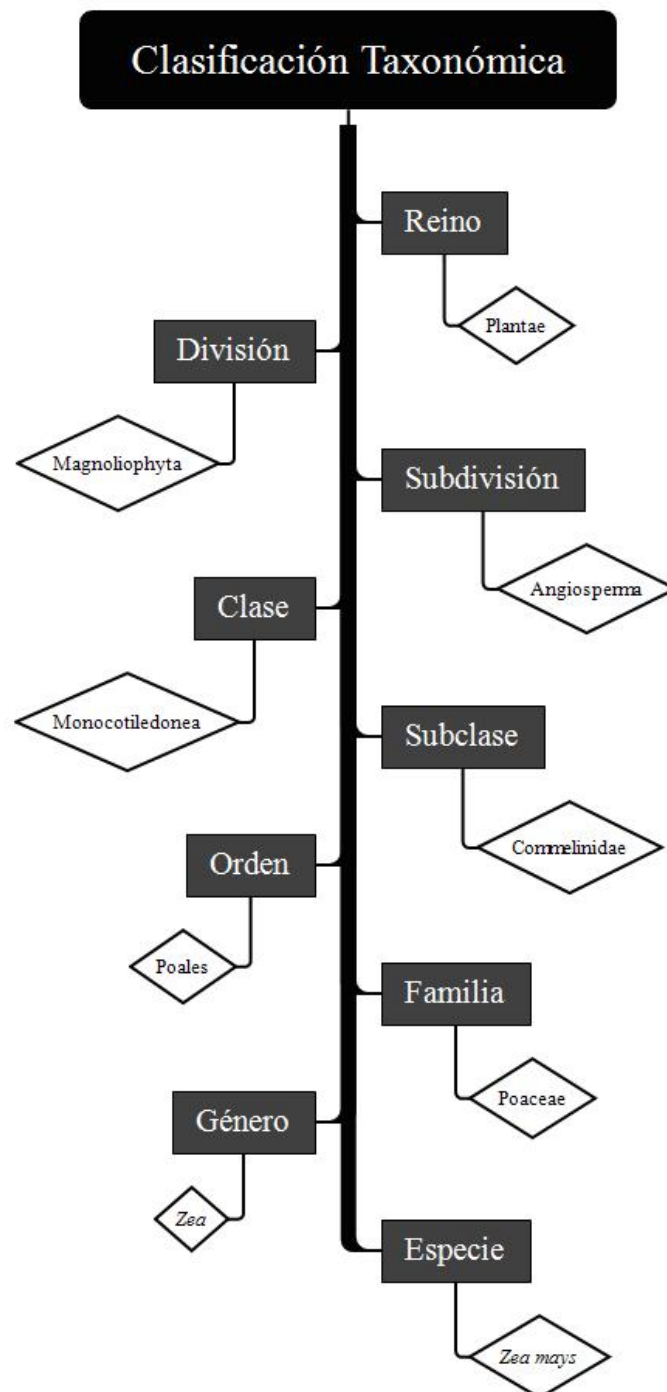
**Figura 3.4.** Ciclo de crecimiento del maíz.

Las variedades ricas en azúcar, llamadas maíz dulce se cultivan generalmente para el consumo humano como granos, mientras que las variedades de maíz de campo se utilizan para la alimentación animal, la elaboración de derivados para alimentación humana

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACETOGENINAS ANNONACEAS

(harina, masa, aceite y mediante fermentación para bebidas alcohólicas como el whisky bourbon) y la obtención de productos químicos como el almidón. El maíz es un cultivo estival que se siembra en ambos hemisferios. En el Hemisferio Sur la ventana de siembra va desde septiembre hasta enero y se cosecha entre marzo y agosto, esto depende del periodo de lluvias y el momento en que comienzan las heladas en cada región. En el Hemisferio Norte se siembra en abril, mayo y se cosecha en septiembre u octubre.

A continuación, se describe la posición sistemática dentro del reino de las plantas.



**3.7.1.1. “Maíz Leales 25” plus**

“Maíz Leales 25” plus, es una variedad de maíz de polinización abierta, subtropical.

Grupo: Cereales de verano

Especie: maíz variedad

Situación registral: Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares (RNPC), Registro Nacional de Cultivares (RNC)

Fecha de inscripción: Jueves 3 de Octubre de 2002

Tipo de licencia: Sin licencia

Contacto técnico: Francisco H Canteros

Contacto vinculación tecnológica: Juan Pablo Gentile, Marcelo Daniel Labarta

**3.7.1.2. Características destacables**

El maíz pertenece a la clase de las monocotiledóneas que son un grupo de angiospermas que posee un sólo cotiledón en su embrión. La altura de la planta es de 260 cm; la altura de inserción de la espiga es de 145 cm, posee una espiga de mediana a grande por planta en posición erguida; tiene 20 a 26 cm de largo, de forma cilindro cónica; 16 a 18 hileras y grano profundo; color del marlo es predominantemente blanco. Grano color anaranjado/colorado, panza blanca, profundo de textura dura. Floración a los 60 días, madurez relativa 131 días.

Zona de siembra recomendada es NEA, NOA y zona intermedia al norte del paralelo 30° LS.

Fecha de siembra recomendada es desde noviembre hasta el 15 de enero.

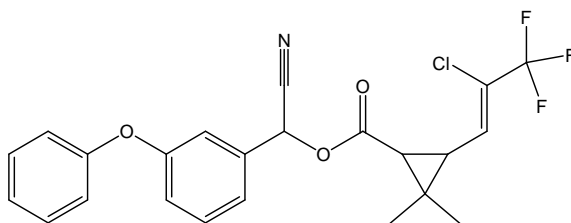
Densidad de plantas a cosecha en la zona de siembra recomendada de 45.000 a 50.000 plantas por hectárea.

Tiene gran resistencia a las principales enfermedades de la región como ser Tizón, pudrición de tallo y espiga y fitoplasma.

Destaca su rusticidad y gran adaptación a la región subtropical.

### 3.8. Insecticida sintético lambda-cihalotrina empleado como control positivo

La cihalotrina, cuyo nombre químico es (*RS*)- -ciano-3-fenoxibencil (1*RS*,3*RS*)-3-[(*Z*)-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil]-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato (Fig. 3.5.) y cuyo nombre común es cihalotrina (ISO), lambda-cihalotrina (ISO) o cyhalotrin, lambda (EPA), es un insecticida de amplio espectro utilizado en la agricultura para el control de plagas ocasionadas por insectos: coleópteros y lepidópteros.



**Figura 3.5.** Estructura química de lambda-cihalotrina.

#### Códigos alfanuméricos

CAS 68085-85-8. CIPAC 405. PC Code 28867. PP 563. Lambda-cihalotrina.

#### 3.8.1. Ingrediente activo

Es un piretroide sintético no sistémico, de gran capacidad de penetración, con actividad insecticida por contacto e ingestión, con buen efecto de choque y buena persistencia que actúa sobre el sistema nervioso de los insectos alterando el flujo de iones a través de la membrana nerviosa. Se ha observado que los piretroides que poseen un grupo -ciano causan una mayor prolongación del aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana nerviosa durante la excitación. El insecto que recibe una dosis suficiente entra en fase de agitación seguida de una parálisis que conduce a la muerte. Produce una fuerte repelencia que evita reinvasiones de insectos en el cultivo. Es activo sobre insectos adultos y también sobre los diferentes estados larvarios en especial de lepidópteros y dípteros. También proporciona un buen control preventivo de los virus de las plantas transmitidos por insectos.

Gracias a su potencial insecticida se aplica en dosis muy bajas en sustancia activa/ha (de 5 a 30 g/ha) con lo que la cantidad de residuos que deposita en la cosecha es muy pequeña.

Se fotodegrada rápidamente y es insoluble en agua. Es prácticamente inmóvil en el suelo con una vida inferior a 14 días en suelos limosos y de 28 a 56 días en arcillo-limosos, con riesgo muy limitado de contaminar acuíferos. En suelos aerobios se degradan por vía hidrolítica y oxidativa, siendo una vida media de unas tres semanas. También se dispersa y reduce por vía microbiana cuya eficiencia disminuye si la humedad del suelo es muy baja o temperatura superior a 35 °C. Se considera poco persistente, llegando a ser su persistencia de 12 semanas.

### 3.8.2. Campo de actividad

Entre las numerosas plagas que controla se destacan: arañas rojas (*Tetranychus spp*), catarina de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), chinche café del sorgo (*Oebalus mexicana*), gusano alfiler (*Keiferia lycopersicella*), gusano bellotero y/o de la yema (*Heliothis virescens*), gusano bellotero o de la fruta (*Helicoverpa zea*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano del fruto de las cucurbitáceas (*Helicoverpa armigera*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), gusano soldado (*Spodothera exigua*), gusanos del fruto (*Heliothis sp*), mariposita blanca de la col (*Pieris rapae*), mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*), mosca migde (*Catarina sorghicola*), mosquita algodonosa (*Aleurotrixus floccosus*), mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), mosquita blanca del algodón (*Bermisia tabaci*), mosquita blanca del tomate (*Bermicia argentifolli*), palomilla dorso del diamante (*Plutella xylostella*), pulgón del algodón y la col (*Aphis gossypii*), pulgón myzus (*Myzus persicae*), trips del algodón (*Thrips tabaci*), trips occidental de las flores (*Frankinella occidentalis*), en cultivos de aguacate, ajo, algodón, brócoli, cebolla, chile, col, tomate, frijol, maíz, papa, soja y trigo.

### 3.8.3. Recomendaciones de uso

Lambda-cihalotrina no resulta fitotóxico para los cultivos y la temperatura afecta su eficacia. Gracias a su lipofilia el producto es fácilmente retenido sobre los cultivos tratados evitándose el lavado por lluvia (De Liñan y col., 2009). Cuando se vaya a aplicar

sobre crucíferas se recomienda adicionar un mojante a base de éter nonfenil polietilenglicol o polipropilenglicol. En estos cultivos, como el nabo, es importante la acción repelente de lambda-cihalotrina contra *Myzus persicae*, transmisor del virus del mosaico (TuMV). Puede resultar peligroso para los crustáceos en época de reproducción. Se recomienda evitar la contaminación de las aguas. Puede utilizarse en programas de lucha integrada en arroz. Extremadamente tóxico para peces y abejas y ligeramente tóxico para aves.

### 3.9. Formulaciones

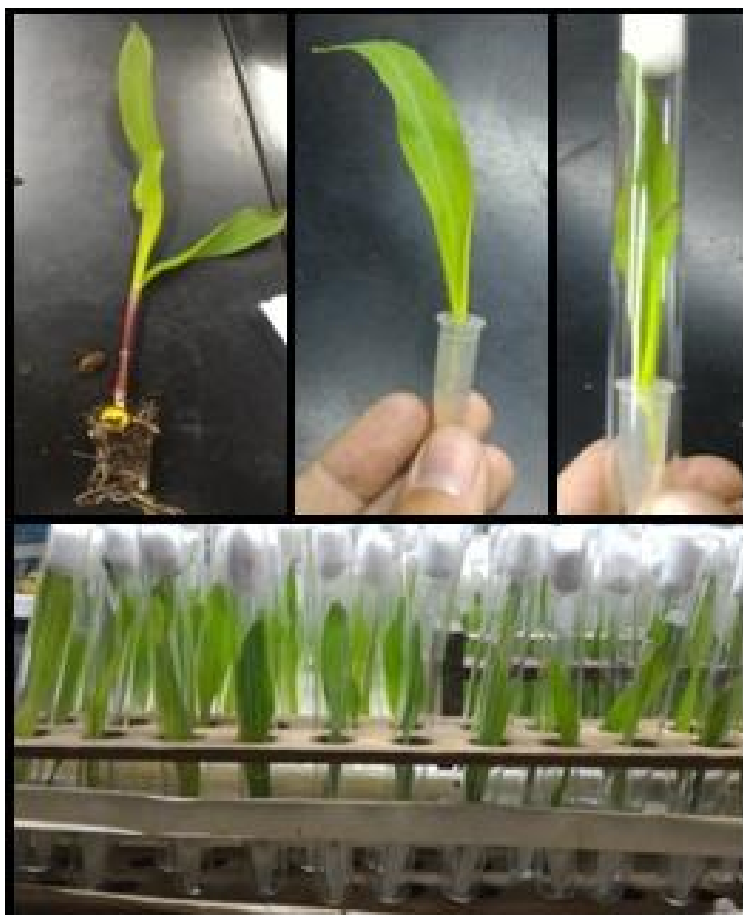
Los subextractos se preparan a 250, 500 y 750  $\mu\text{g/mL}$  con agua destilada y polisorbato 20 como agente tensioactivo no iónico (Tween 20®). Las soluciones de las ACG naturales y de las ACG acetilada y metoximetilada se preparan a 100  $\mu\text{g/mL}$ , en las mismas condiciones.

De acuerdo a datos de bibliografía, el insecticida comercial de referencia tóxica, lambda-cihalotrina, se prepara a 250  $\mu\text{g/mL}$  (Al-Sarar y col., 2006; Hardke y col., 2011; Ríos-Díez y col., 2011). Es la concentración a la que se produce la mortalidad del 100% de la población del lepidóptero. Como control benigno se usa agua destilada más surfactante (Tween 20®).

### 3.10. Diseño del bioensayo a semicampo

El ensayo se lleva a cabo con semillas de *Zea mays* L. variedad "Leales 25". Se siembran individualmente entre 100 y 150 semillas en una superficie de 0,125 m<sup>2</sup>, en un hábitat artificial. Durante su desarrollo, los plantines no fueron tratados con productos de protección. Una vez alcanzado el crecimiento indicado de los plantines (tres hojas), se cortan y se asperjan con los productos a ensayar (20 repeticiones para cada compuesto control y tratado), hasta el punto de goteo utilizando pulverizadores manuales bajo campana extractora. Una vez secas, aproximadamente después de 3 a 4 h, se introduce el peciolo de una hoja de 4 a 6 centímetros de largo, en un eppendorf de 1,5 mL, que contiene agar al 1,5% para evitar la deshidratación foliar. Se coloca cada eppendorf en un tubo de ensayo de 1,2 cm de diámetro interno y 15 cm de alto. En cada tubo se introduce una larva

de *S. frugiperda* de tercer estadio (Fig. 3.6.). El ensayo se lleva a cabo en cámara con temperatura a  $25 \pm 2$  °C, humedad relativa  $75 \pm 5\%$  y fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad). Se toman fotografías de las hojas al inicio y fin del ensayo que nos indican el daño foliar ocasionado por las larvas.



**Figura 3.6.** Diseño del bioensayo a semicampo.

### 3.11. Evaluación del efecto tóxico

Al cabo de 24, 48 y 72 h de la aplicación con los diferentes compuestos, se evalúa el efecto tóxico de los mismos teniendo en cuenta la mortalidad de las larvas de *S. frugiperda*.

## 4. Bioensayos en laboratorio y a semicampo

### 4.1. Resultados de los bioensayos en laboratorio

Evaluamos los efectos antialimentarios y tóxicos de subextractos de diferentes especies del género *Annona*, ACG naturales y ACG modificadas estructuralmente, sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Los bioensayos se realizaron adicionando a la dieta larval de *S. frugiperda* los siguientes compuestos:

- Subextractos clorofórmicos de 3 especies diferentes del género *Annona*
- 3 ACG mono-THF
- 3 ACG bis-THF no adyacentes
- 7 ACG bis-THF adyacentes
- 3 ACG mono-THF acetiladas químicamente
- 5 ACG bis-THF adyacentes acetiladas químicamente
- 2 ACG bis-THF adyacentes acetiladas enzimáticamente
- 3 ACG bis-THF adyacente metoximetiladas

#### 4.1.1. Subextractos clorofórmicos

Se estudió la actividad antialimentaria, los efectos tóxicos y las alteraciones nutricionales que los subextractos clorofórmicos de *Annona squamosa* (**SE1**), *A. montana* (**SE2**) y *A. muricata* (**SE3**) producen sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  de los sub extractos clorofórmicos **SE1**, **SE2** y **SE3**, añadidos a las dietas de las larvas no mostró efecto antialimentario, con un  $\text{FR}_{50} = 1,19 \pm 0,17$ ,  $1,02 \pm 0,33$  y  $0,97 \pm 0,16$ , respectivamente. El subextracto **SE1** produjo significativa mortalidad larval (Fig. 4.1. A), debido a lo cual se observó disminución en la emergencia de adultos. Los subextractos **SE2** y **SE3** produjeron baja mortalidad larval y pupal (Fig. 4.1. B), por lo que se observó alta emergencia de adultos (Tabla 4.1.).





**Figura 4.1.** A: Larva de *S. frugiperda* tratada con SE1; B: Pupa de *S. frugiperda* tratada con SE3.

**Tabla 4.1.** Efectos antialimentarios y tóxicos de SE1, SE2 y SE3 sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	FR <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
<i>A. squamosa</i> (SE1)	1,19±0,17 <sup>a</sup>	65	10	25
<i>A. montana</i> (SE2)	1,02±0,33 <sup>a,b</sup>	0	5	95
<i>A. muricata</i> (SE3)	0,97±0,16 <sup>b</sup>	25	20	55

\* Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

Las larvas alimentadas con dieta tratada con el subextracto clorofórmico SE1 muestra bajo porcentaje de consumo con respecto al control, CI<sub>T</sub>/CI<sub>C</sub>=49±11%, marcada disminución en el crecimiento larval, GR<sub>T</sub>/GR<sub>C</sub>=16±7%, como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa ECI<sub>T</sub>/ECI<sub>C</sub>=32±12% (Tabla 4.2.). Las larvas alimentadas con dieta tratada con SE2 y SE3 no muestran alteraciones nutricionales significativas con respecto al control.

**Tabla 4.2.** Efectos nutricionales de SE1, SE2 y SE3 sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	CI <sub>T</sub> /CI <sub>C</sub> (%)	GR <sub>T</sub> /GR <sub>C</sub> (%)	ECI <sub>T</sub> /ECI <sub>C</sub> (%)
<i>A. squamosa</i> (SE1)	49±11 <sup>c</sup>	16±7 <sup>b</sup>	32±12 <sup>b</sup>
<i>A. montana</i> (SE2)	83±5 <sup>b</sup>	84±15 <sup>a</sup>	101±16 <sup>a</sup>
<i>A. muricata</i> (SE3)	94±9 <sup>a</sup>	89±16 <sup>a</sup>	94±13 <sup>a</sup>

\*Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; CI<sub>T</sub>/CI<sub>C</sub> (%): Índice de consumo, GR<sub>T</sub>/GR<sub>C</sub> (%): Índice de crecimiento, ECI<sub>T</sub>/ECI<sub>C</sub> (%): Índice de eficacia del consumo. <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control.

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

El tratamiento a 250  $\mu\text{g/g}$  con los subextractos clorofórmicos **SE1**, **SE2** y **SE3** añadidos a la dieta larval, no mostró efecto antialimentario en ningún caso, con  $\text{FR}_{50}=0,76\pm0,34$ ;  $0,94\pm0,15$  y  $0,87\pm0,21$ , respectivamente. El subextracto **SE1**, produjo significativa mortalidad larval, en consecuencia, se observó baja emergencia de adultos. Los subextractos **SE2** y **SE3** produjeron baja mortalidad larval y alta emergencia de adultos (Tabla 4.3.).

**Tabla 4.3.** Efectos antialimentarios y tóxicos de **SE1**, **SE2** y **SE3** sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	$\text{FR}_{50}^a$	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
<i>A. squamosa</i> ( <b>SE1</b> )	$0,76\pm0,34^b$	90	0	10
<i>A. montana</i> ( <b>SE2</b> )	$0,94\pm0,15^a$	0	0	100
<i>A. muricata</i> ( <b>SE3</b> )	$0,87\pm0,21^{a,b}$	5	0	95

\* Dosis del tratamiento: 250  $\mu\text{g}$  por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media  $\pm$  SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control.

Las larvas alimentadas con dieta tratada y el subextracto **SE1**, mostraron bajo porcentaje de consumo,  $\text{CI}_T/\text{CI}_C=52\pm7\%$ , lo que provocó marcada disminución en el crecimiento larval,  $\text{GR}_T/\text{GR}_C=9\pm1\%$ , como así también, baja eficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $\text{ECI}_T/\text{ECI}_C=19\pm4\%$  (Tabla 4.4.). Las larvas alimentadas con dieta tratada con **SE2**, no mostraron alteraciones nutricionales con diferencias significativas con respecto al control. La adición a la dieta de **SE3**, provocó alteraciones nutricionales en las larvas, pero no fueron tan significativas como con **SE1**. Mostraron, bajo porcentaje de consumo,  $\text{CI}_T/\text{CI}_C=63\pm4\%$ , disminución en el crecimiento larval,  $\text{GR}_T/\text{GR}_C=45\pm11\%$ , como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $\text{ECI}_T/\text{ECI}_C=72\pm15\%$  (Tabla 4.4.).

**Tabla 4.4.** Efectos nutricionales de **SE1**, **SE2** y **SE3** sobre *S. frugiperda*

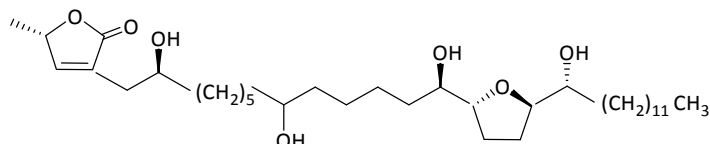
Compuestos*	$\text{CI}_T/\text{CI}_C$ (%)	$\text{GR}_T/\text{GR}_C$ (%)	$\text{ECI}_T/\text{ECI}_C$ (%)
<i>A. squamosa</i> ( <b>SE1</b> )	$52\pm7^c$	$9\pm1^c$	$19\pm4^c$
<i>A. montana</i> ( <b>SE2</b> )	$77\pm3^a$	$77\pm7^a$	$100\pm10^a$
<i>A. muricata</i> ( <b>SE3</b> )	$63\pm4^b$	$45\pm11^b$	$72\pm15^b$

\*Dosis del tratamiento: 250  $\mu\text{g}$  por gramo de dieta;  $\text{CI}_T/\text{CI}_C$  (%): Índice de consumo,  $\text{GR}_T/\text{GR}_C$  (%): Índice de crecimiento,  $\text{ECI}_T/\text{ECI}_C$  (%): Índice de eficacia del consumo. <sup>a</sup>Media  $\pm$  SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control.

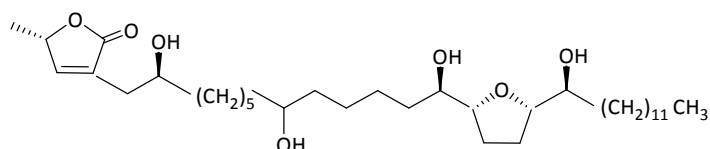
#### 4.1.2. ACG mono-THF

Los efectos antialimentarios y tóxicos que producen las ACG mono-THF, annonacin (**1**), *cis*-annonacin (**2**), *cis*-annonacin-10-one (**3**) (Fig. 4.2.) producen sobre *S. frugiperda* se muestran en la Tabla 4.5.

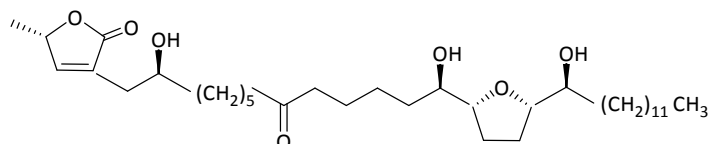
##### annonacin (**1**)



##### *cis*-annonacin (**2**)



##### *cis*-annonacin-10-one (**3**)



**Figura 4.2.** ACG mono-THF utilizadas en los ensayos sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  con las ACG **1**, **2** y **3** añadidas a las dietas de las larvas no mostró efecto antialimentario, con un  $\text{FR}_{50}=1,15\pm0,34$ ;  $1,02\pm0,20$  y  $0,98\pm0,13$ , respectivamente. Las ACG **1** y **3** produjeron muy baja mortalidad larval (5% y 0%, respectivamente), debido a lo cual se observó elevada emergencia de adultos (Tabla 4.5.). El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  con la ACG **2** añadida a la dieta de las larvas produjo mortalidad superior al 50% en los primeros estadios larvales. Sin embargo, la ACG **3**, cuya estructura se diferencia de **2** en tan sólo el patrón de sustitución en C-10, no mostró efectos tóxicos sobre *S. frugiperda* (Tabla 4.5.).

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

**Tabla 4.5.** Efectos antialimentarios y tóxicos de ACG mono-THF adyacentes sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	FR <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
annonacin ( <b>1</b> )	1,15±0,34 <sup>a</sup>	5	0	95
<i>cis</i> -annonacin ( <b>2</b> )	1,02±0,20 <sup>a</sup>	60	0	40
<i>cis</i> -annonacin-10 one ( <b>3</b> )	0,98±0,13 <sup>a</sup>	0	5	95

\*Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

Las larvas alimentadas con dieta tratada con ACG **2**, muestra alto porcentaje de consumo,  $CI_T/CI_C = 89 \pm 7\%$  y marcada disminución en el crecimiento larval,  $GR_T/GR_C = 44 \pm 14\%$ , como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECl_T/ECl_C = 49 \pm 13\%$  (Fig. 4.3.). Las larvas alimentadas con dieta tratada **1** y **3**, si bien, no muestran entre ellas diferencias significativas en el consumo, en el crecimiento y la eficiencia de conversión de nutrientes, **1** es más efectiva que **3** (Tabla 4.6.).

**Tabla 4.6.** Efectos nutricionales producidas por ACG mono-THF sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	CI <sub>T</sub> /CI <sub>C</sub> (%)	GR <sub>T</sub> /GR <sub>C</sub> (%)	ECl <sub>T</sub> /ECl <sub>C</sub> (%)
annonacin ( <b>1</b> )	79±5 <sup>b</sup>	74±17 <sup>a</sup>	94±18 <sup>a</sup>
<i>cis</i> -annonacin ( <b>2</b> )	89±7 <sup>a</sup>	44±14 <sup>b</sup>	49±13 <sup>c</sup>
<i>cis</i> -annonacin-10 one ( <b>3</b> )	77±8 <sup>b</sup>	58±14 <sup>b</sup>	74±13 <sup>b</sup>

\*Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; CI<sub>T</sub>/CI<sub>C</sub> (%): Índice de consumo, GR<sub>T</sub>/GR<sub>C</sub> (%): Índice de crecimiento. ECl<sub>T</sub>/ECl<sub>C</sub> (%): Índice de eficacia del consumo; <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

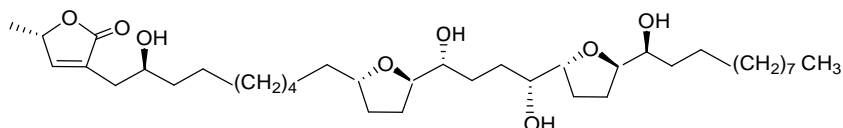


**Figura 4.3.** Larva de *S. frugiperda*. **A:** control; **B:** tratada con *cis*-annonacin.

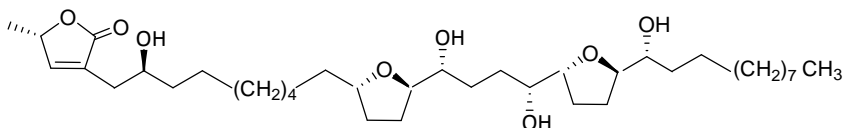
#### 4.1.3. ACG bis-THF no adyacentes

Los efectos antialimentarios y tóxicos que las ACG bis-THF no adyacentes, cherimolin-1 (**4**), cherimolin-2 (**5**), almuñequin (**6**) (Fig. 4.4.) producen sobre *S. frugiperda* se muestran en la Tabla 4.7.

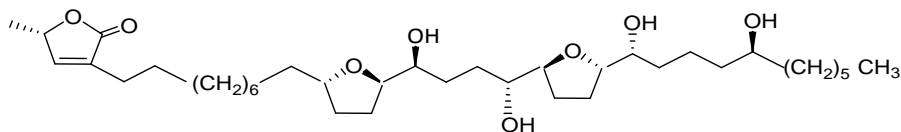
##### cherimolin-1 (**4**)



##### cherimolin-2 (**5**)



##### almuñequin (**6**)



**Figura 4.4.** ACG bis-THF no adyacentes utilizadas en los ensayos sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  con las ACG **4**, **5** y **6** añadidas a las dietas de las larvas no mostró efecto antialimentario, con un  $\text{FR}_{50} = 0,88 \pm 0,23$ ;  $0,97 \pm 0,25$  y  $0,89 \pm 0,22$ , respectivamente. Las ACG **4**, **5** y **6** produjeron baja mortalidad larval (15%, 5% y 20%, respectivamente), como consecuencia se observó elevada emergencia de adultos (Tabla 4.7.).

**Tabla 4.7.** Efectos antialimentarios y tóxicos de ACG bis-THF no adyacentes sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	$\text{FR}_{50}^a$	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
cherimolin-1 ( <b>4</b> )	$0,88 \pm 0,23^a$	15	0	85
cherimolin-2 ( <b>5</b> )	$0,97 \pm 0,25^a$	5	0	95
almuñequin ( <b>6</b> )	$0,89 \pm 0,22^a$	20	0	80

\* Dosis del tratamiento: 100  $\mu\text{g}$  por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media  $\pm$  SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

Las larvas alimentadas con dieta tratada con la ACG **6** muestra alto porcentaje de consumo,  $CI_T/CI_C = 86 \pm 6\%$ , marcada disminución en el crecimiento larval,  $GR_T/GR_C = 59 \pm 16\%$ , como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C = 69 \pm 15\%$ . Las larvas alimentadas con dieta tratada con **4** y **5**, no presentan alteraciones nutricionales significativas con respecto al control (Tabla 4.8.).

**Tabla 4.8.** Efectos nutricionales de ACG bis-THF no adyacentes sobre *S. frugiperda*

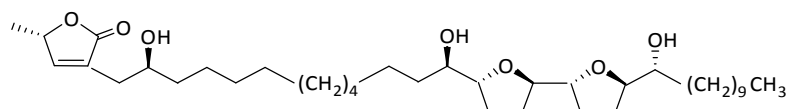
Compuestos*	$CI_T/CI_C$ (%)	$GR_T/GR_C$ (%)	$ECI_T/ECI_C$ (%)
cherimolin-1 ( <b>4</b> )	$94 \pm 6^a$	$72 \pm 12^a$	$78 \pm 12^{a,b}$
cherimolin-2 ( <b>5</b> )	$90 \pm 6^{a,b}$	$75 \pm 14^a$	$84 \pm 15^a$
almuñequin ( <b>6</b> )	$86 \pm 6^b$	$59 \pm 16^b$	$69 \pm 15^b$

\*Dosis del tratamiento: 100  $\mu\text{g}$  por gramo de dieta;  $CI_T/CI_C$  (%): Índice de consumo,  $GR_T/GR_C$  (%): Índice de crecimiento.  $ECI_T/ECI_C$  (%): Índice de eficacia del consumo; <sup>a</sup>Media  $\pm$  SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

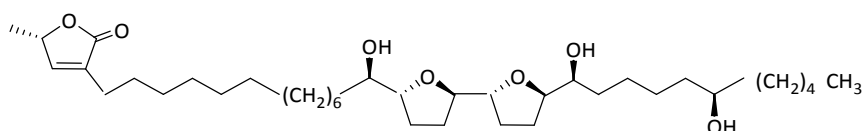
#### 4.1.4. ACG bis-THF adyacentes

Los efectos antialimentarios y tóxicos que las ACG bis-THF adyacentes, rolliniastatin-2 (7), motrilin (8), squamocin (9), molvizarin (10), asimicin (11), laherradurin (12), itrabin (13) (Fig. 4.5.) producen sobre *S. frugiperda* se muestran en la Tabla 4.9.

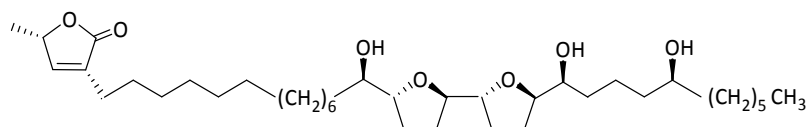
##### rolliniastatin-2 (7)



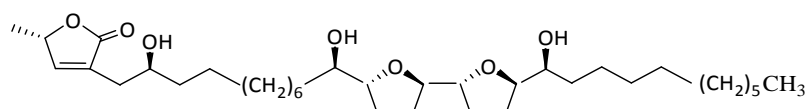
##### motrilin (8)



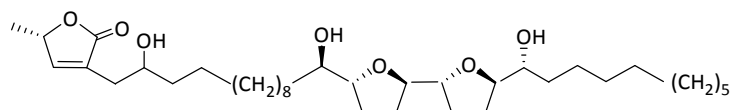
##### squamocin (9)



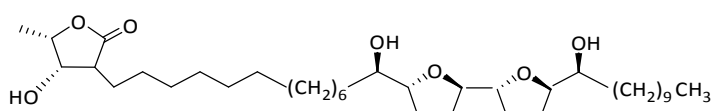
##### molvizarin (10)



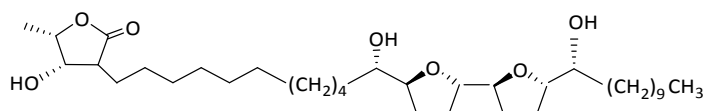
##### asimicin (11)



##### laherradurin (12)



**itrabin (13)**



**Figura 4.5.** ACG bis-THF adyacentes utilizadas en los ensayos sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  con las ACG **7**, **8**, **10**, **11**, **12** y **13** añadidas a la dieta de las larvas no mostró efecto antialimentario, con un  $\text{FR}_{50} = 0,99 \pm 0,15$ ;  $1,09 \pm 0,15$ ;  $1,00 \pm 0,15$ ;  $1,02 \pm 0,28$ ;  $0,81 \pm 0,18$  y  $0,99 \pm 0,19$ , respectivamente; a excepción de la ACG **9** que dio un  $\text{FR}_{50} = 0,66 \pm 0,17$ . Los compuestos **7**, **8**, **9**, **10**, **11** y **12** produjeron significativa mortalidad larval, entre 70-100%. La ACG **8**, a su vez, produjo mortalidad pupal (15%), debido a lo cual, se observó muy baja emergencia de adultos. La ACG **13**, produjo moderada mortalidad larval (45%) y moderada emergencia de adultos (Tabla 4.9.).

**Tabla 4.9.** Efectos antialimentarios y tóxicos de ACG bis-THF adyacentes sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	$\text{FR}_{50}^a$	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
rolliniastatin-2 ( <b>7</b> )	$0,99 \pm 0,15^{a,b}$	100	0	0
motrilin ( <b>8</b> )	$1,09 \pm 0,15^a$	80	15	5
squamocin ( <b>9</b> )	$0,66 \pm 0,17^c$	100	0	0
molvizarin ( <b>10</b> )	$1,00 \pm 0,15^{a,b}$	100	0	0
asimicin ( <b>11</b> )	$1,02 \pm 0,28^a$	85	0	15
laherradurin ( <b>12</b> )	$0,81 \pm 0,18^{b,c}$	70	0	30
itrabin ( <b>13</b> )	$0,99 \pm 0,19^{a,b}$	45	0	55

\* Dosis del tratamiento: 100  $\mu\text{g}$  por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media  $\pm$  SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

Las ACG **7**, **9** y **10**, producen mortalidades larvales en estadios tempranos, por lo cual los efectos nutricionales que ocasionan no pudieron ser evaluados.

Las larvas alimentadas con dieta tratada con ACG **8**, muestran elevado porcentaje de consumo,  $\text{CI}_T/\text{CI}_C = 77 \pm 2\%$ , significativa disminución en el crecimiento larval  $\text{GR}_T/\text{GR}_C =$



## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

12±2%, como así también, significativa ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C = 16 \pm 2\%$  (Tabla 4.10.).

Las larvas alimentadas con dieta tratada con las ACG **11**, **12** y **13**, mostraron bajo porcentaje de consumo,  $CI_T/CI_C = 58 \pm 4\%$ ;  $45 \pm 4\%$ ; y  $48 \pm 2\%$ , respectivamente y marcada disminución en el crecimiento larval,  $GR_T/GR_C = 27 \pm 6\%$ ;  $4 \pm 2\%$  y  $11 \pm 2\%$ , como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C = 46 \pm 7\%$ ;  $8 \pm 4\%$  y  $23 \pm 4\%$  (Tabla 4.10.).

**Tabla 4.10.** Efectos nutricionales de ACG bis-THF adyacentes sobre *S. frugiperda*

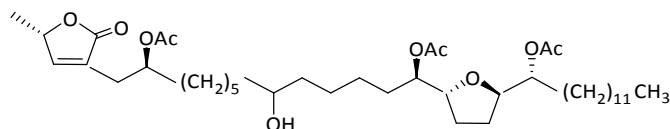
Compuestos*	$CI_t/CI_c$ (%)	$GR_t/GR_c$ (%)	$ECI_t/ECI_c$ (%)
rolliniastatin-2 ( <b>7</b> )	N/D	N/D	N/D
motrilin ( <b>8</b> )	$77 \pm 2^a$	$12 \pm 2^b$	$16 \pm 2^{b,c}$
squamocin ( <b>9</b> )	N/D	N/D	N/D
molvizarin ( <b>10</b> )	N/D	N/D	N/D
asimicin ( <b>11</b> )	$58 \pm 4^b$	$27 \pm 6^a$	$46 \pm 7^a$
laherradurin ( <b>12</b> )	$45 \pm 4^c$	$4 \pm 2^c$	$8 \pm 4^c$
itrabin ( <b>13</b> )	$48 \pm 2^c$	$11 \pm 2^b$	$23 \pm 4^b$

\*Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta;  $CI_t/CI_c$  (%): Índice de consumo,  $GR_t/GR_c$  (%): Índice de crecimiento.  $ECI_t/ECI_c$  (%): Índice de eficacia del consumo. <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

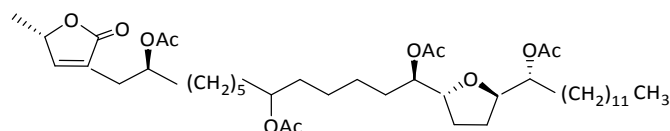
#### 4.1.5. ACG mono-THF acetiladas químicamente

Se estudió la actividad antialimentaria, los efectos tóxicos y las alteraciones nutricionales que producen sobre *S. frugiperda* las ACG mono-THF acetiladas, annonacin tri-acetilada (**14**), annonacin tetra-acetilada (**15**) y *cis*-annonacin-10-one tria-cetilada (**16**) (Fig. 4.6.).

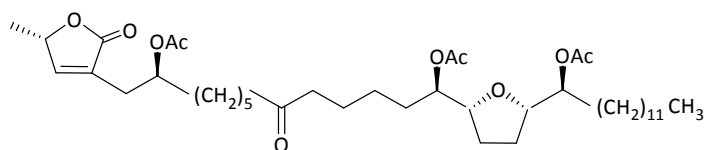
##### annonacin tri-acetilada (**14**)



##### annonacin tetra-acetilada (**15**)



##### *cis*-annonacin-10-one tri-acetilada (**16**)



**Figura .4.6.** ACG mono-THF acetiladas químicamente utilizadas en los ensayos sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  de las ACG **14**, **15** y **16** añadidas a la dieta de las larvas no mostró efecto antialimentario, con un  $\text{FR}_{50} = 1,13 \pm 0,42$ ;  $1,13 \pm 0,37$  y  $0,89 \pm 0,16$ , respectivamente. Las ACG **14**, **15** y **16** produjeron baja mortalidad larval y alta emergencia de adultos (Tabla 4.11.).

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

**Tabla 4.11.** Efectos antialimentarios y tóxicos de ACG mono-THF acetiladas químicamente sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	FR <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
annonacin tri-acetilada (14)	1,13±0,42 <sup>a</sup>	5	0	95
annonacin tetra-acetilada (15)	1,13±0,37 <sup>a</sup>	10	0	90
cis-annonacin-10-one tri-acetilada (16)	0,89±0,16 <sup>a</sup>	0	0	100

\* Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

Las larvas que se alimentaron con adición a la dieta de annonacin tri-acetilada (14) y annonacin tetra-acetilada (15), produjeron emergencia de adultos malformados como se muestra en la Figura 4.7.



**Figura 4.7.** Adultos de *S. frugiperda*. A: control; B y C: (14); D: (15).

Las larvas alimentadas con dieta tratada con las ACG 14 y 15, mostraron alto porcentaje de consumo,  $CI_T/CI_C=83\pm6\%$  y  $83\pm5\%$  respectivamente; alto crecimiento larval  $GR_T/GR_C=87\pm20\%$  y  $85\pm20\%$ , como así también, elevada eficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C=104\pm20\%$  y  $102\pm20\%$ , respectivamente (Tabla 4.12.). Sin embargo, la ACG 16, mostró bajo consumo  $CI_T/CI_C=62\pm4\%$  y bajo crecimiento  $GR_T/GR_C=31\pm6\%$ , como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C=50\pm8\%$ . Las larvas alimentadas con dieta

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

tratada con **14** y **15**, no produjeron alteraciones nutricionales significativas con respecto al control como se muestran en la Tabla 4.12.

**Tabla 4.12.** Efectos nutricionales de ACG mono-THF acetiladas químicamente sobre *S. frugiperda*

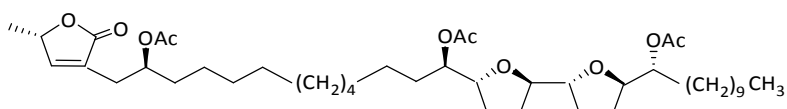
Compuestos*	CI <sub>t</sub> /CI <sub>c</sub> (%)	GR <sub>t</sub> /GR <sub>c</sub> (%)	ECI <sub>t</sub> /ECI <sub>c</sub> (%)
annonacin tri-acetilada ( <b>14</b> )	83±6 <sup>a</sup>	87±20 <sup>a</sup>	104±20 <sup>a</sup>
annonacin tetra-acetilada ( <b>15</b> )	83±5 <sup>a</sup>	85±20 <sup>a</sup>	102±20 <sup>a</sup>
<i>cis</i> -annonacin-10-one tri-acetilada ( <b>16</b> )	62±4 <sup>b</sup>	31±6 <sup>b</sup>	50±8 <sup>b</sup>

\*Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; CI<sub>t</sub>/CI<sub>c</sub> (%): Índice de consumo, GR<sub>t</sub>/GR<sub>c</sub> (%): Índice de crecimiento, ECI<sub>t</sub>/ECI<sub>c</sub> (%): Índice de eficacia del consumo. <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

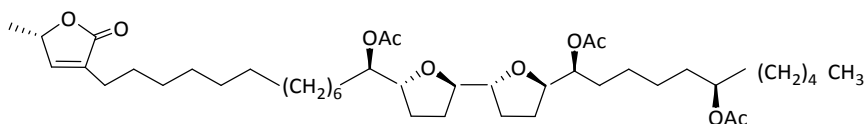
#### 4.1.6. ACG Bis-THF adyacentes acetiladas químicamente

Se estudió la actividad antialimentaria, los efectos tóxicos y las alteraciones nutricionales que las ACG bis-THF adyacentes acetiladas químicamente, rolliniastatin-2 tri-acetilada (**17**), motrilin tri-acetilada (**18**), squamocin tri-acetilada (**19**), molvizarin tri-acetilada (**20**) y asimicin tri-acetilada (**21**) (Fig. 4.8.) producen sobre *S. frugiperda*.

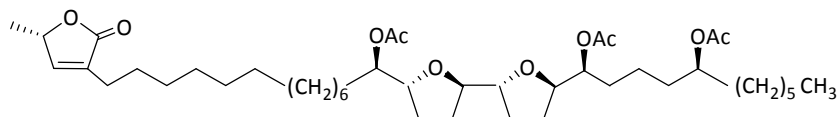
##### rolliniastatin-2 tri-acetilada (**17**)



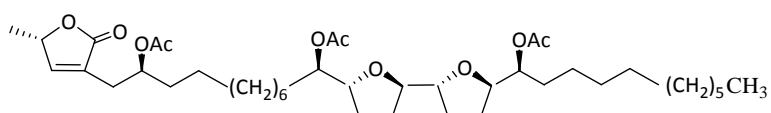
##### motrilin tri-acetilada (**18**)



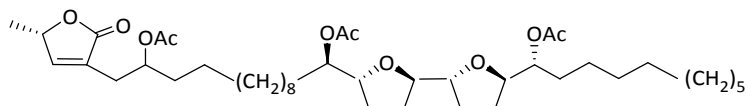
##### squamocin tri-acetilada (**19**)



##### molvizarin tri-acetilada (**20**)



##### asimicin tri-acetilada (**21**)



**Figura 4.8.** ACG bis-THF adyacentes acetiladas químicamente utilizadas en los ensayos sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  de las ACG **17**, **18**, **19**, **20** y **21** añadidas a la dieta de las larvas no mostró efecto antialimentario, con un  $\text{FR}_{50} = 0,68 \pm 0,10$ ;  $0,96 \pm 0,15$ ;  $0,77 \pm 0,14$ ;

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

1,21±0,21 y 1,02±0,28, respectivamente (Tabla 4.13.). Las ACG **17** y **20** produjeron significativa mortalidad larval y baja emergencia de adultos con mal formaciones (Fig. 4.9).



**Figura 4.9.** Pupas y adultos de *S. frugiperda*. A y B: Control; C: (20); D y E: (17).

**Tabla 4.13.** Efectos antialimentarios y tóxicos de ACG bis-THF adyacentes acetiladas químicamente sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	FR <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
rolliniastatin-2 tri-acetilada ( <b>17</b> )	0,68±0,10 <sup>d</sup>	40	5	55
motrilin tri-acetilada ( <b>18</b> )	0,96±0,15 <sup>b</sup>	80	0	20
squamocin tri-acetilada ( <b>19</b> )	0,77±0,14 <sup>c</sup>	45	30	25
molvizarin tri-acetilada ( <b>20</b> )	1,21±0,21 <sup>a</sup>	60	30	10
asimicin tri-acetilada ( <b>21</b> )	1,02±0,28 <sup>b</sup>	85	0	15

\* Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

Las larvas alimentadas con dieta tratada con las ACG **17** y **21**, mostraron bajo porcentaje de consumo, CI<sub>T</sub>/CI<sub>C</sub>=49±14% y 58±4%, respectivamente, marcada disminución en el crecimiento larval, GR<sub>T</sub>/GR<sub>C</sub>=27±9% y 27±6%, como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa ECI<sub>T</sub>/ECI<sub>C</sub>=55±12% y 46±7% (Tabla 4.14.). Las larvas alimentadas con dieta tratada con **19** y **20**, mostraron alto porcentaje de consumo, CI<sub>T</sub>/CI<sub>C</sub>= 97±7% y 83±9%, marcada disminución en el crecimiento larval

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

$GR_T/GR_C=33\pm3\%$  y  $47\pm10\%$ , como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C=34\pm16\%$  y  $56\pm12\%$  (Tabla 4.14.). Las larvas alimentadas con dieta tratada con **18** mostró alto porcentaje de consumo,  $CI_T/CI_C=92\pm4\%$ , alto crecimiento larval  $GR_T/GR_C=85\pm16\%$ , como así también, eficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C=92\pm17\%$  (Tabla 4.14).

**Tabla 4.14.** Efectos nutricionales de ACG bis-THF adyacentes acetiladas químicamente sobre *S. frugiperda*

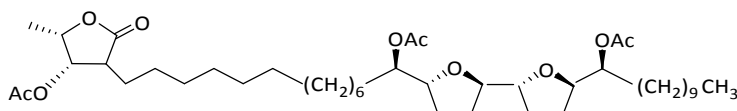
Compuestos*	$CI_T/CI_C$ (%)	$GR_T/GR_C$ (%)	$ECI_T/ECI_C$ (%)
rolliniastatin-2 tri-acetilada (17)	$49\pm14^c$	$27\pm9^c$	$55\pm12^b$
motrilin tri-acetilada (18)	$92\pm4^{a,b}$	$85\pm16^a$	$92\pm17^a$
squamocin tri-acetilada (19)	$97\pm7^a$	$33\pm3^c$	$34\pm16^c$
molvizarin tri-acetilada (20)	$83\pm9^b$	$47\pm10^b$	$56\pm12^b$
asimicin tri-acetilada (21)	$58\pm4^c$	$27\pm6^d$	$46\pm7^d$

\*Dosis del tratamiento: 100  $\mu$ g por gramo de dieta;  $CI_T/CI_C$  (%): Índice de consumo,  $GR_T/GR_C$  (%): Índice de crecimiento.  $ECI_T/ECI_C$  (%): Índice de eficacia del consumo. <sup>a</sup>Media  $\pm$  SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

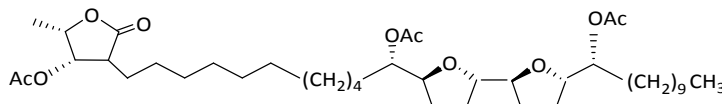
#### 4.1.7. ACG Bis-THF adyacentes acetiladas enzimáticamente

Se estudió la actividad antialimentaria, los efectos tóxicos y las alteraciones nutricionales que las ACG bis-THF adyacentes acetiladas enzimáticamente, laherradurin tri-acetilada (**22**) e itrabin tri-acetilada (**23**) (Fig. 4.10.) producen sobre *S. frugiperda*.

##### laherradurin tri-acetilada (**22**)



##### itrabin tri-acetilada (**23**)



**Figura 4.10.** ACG bis-THF adyacentes acetiladas enzimáticamente utilizadas en los ensayos sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  con las ACG **22** y **23** añadidas a las dietas de las larvas no mostró efecto antialimentario, con un  $\text{FR}_{50} = 0,93 \pm 0,16$  y  $0,94 \pm 0,14$ , respectivamente. Produjeron significativa mortalidad larval (65% en ambos casos), debido a lo cual no se observó elevada emergencia de adultos (Tabla 4.15.).

**Tabla 4.15.** Efectos antialimentarios y tóxicos de ACG bis-THF adyacentes acetiladas enzimáticamente sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	$\text{FR}_{50}^a$	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
laherradurin tri-acetilada ( <b>22</b> )	$0,93 \pm 0,16^a$	65	0	35
itrabin tri-acetilada ( <b>23</b> )	$0,94 \pm 0,14^a$	65	0	35

\* Dosis del tratamiento: 100  $\mu\text{g}$  por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media  $\pm$  SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

Las larvas alimentadas con dieta tratada con las ACG **22** y **23**, mostraron bajo porcentaje de consumo,  $\text{CI}_T/\text{CI}_C = 40 \pm 3\%$  y  $47 \pm 4\%$ , respectivamente y marcada disminución en el



## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

crecimiento larval,  $GR_T/GR_C=3\pm1\%$  y  $9\pm4\%$ , como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa  $ECI_T/ECI_C=7\pm2\%$  y  $20\pm8\%$  (Tabla 4.16.).

**Tabla 4.16.** Efectos nutricionales de ACG bis-THF acetiladas enzimáticamente sobre *S. frugiperda*

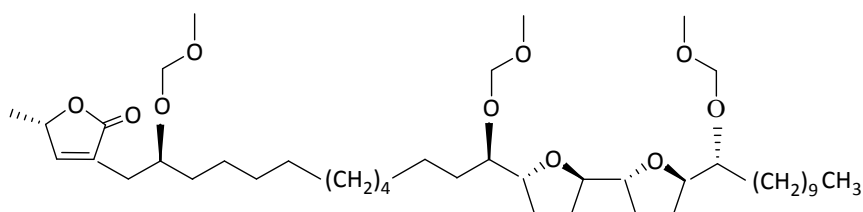
Compuestos*	CI <sub>t</sub> /CI <sub>c</sub> (%)	GR <sub>t</sub> /GR <sub>c</sub> (%)	ECI <sub>t</sub> /ECI <sub>c</sub> (%)
laherradurin tri-acetilada (22)	40±3 <sup>b</sup>	3±1 <sup>b</sup>	7±2 <sup>b</sup>
itrabin tri-acetilada (23)	47±4 <sup>a</sup>	9±4 <sup>a</sup>	20±8 <sup>a</sup>

\*Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; CI<sub>t</sub>/CI<sub>c</sub> (%): Índice de consumo, GR<sub>t</sub>/GR<sub>c</sub> (%): Índice de crecimiento. ECI<sub>t</sub>/ECI<sub>c</sub> (%): Índice de eficacia del consumo. <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

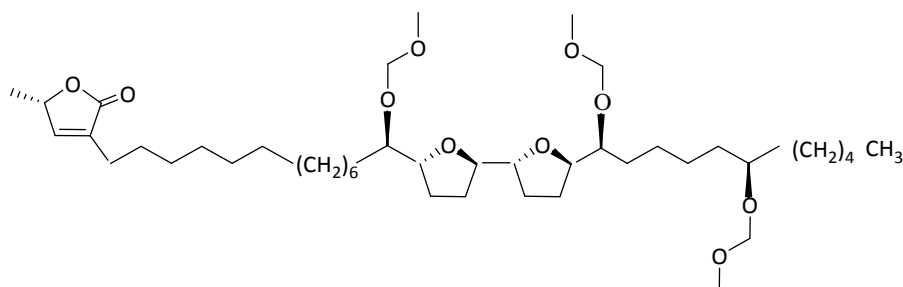
#### 4.1.8. ACG bis-THF metoximetiladas

Se estudió la actividad antialimentaria, los efectos tóxicos y las alteraciones nutricionales que las ACG bis-THF adyacentes metoximetiladas, rolliniastatin-2 tri-metoximetilada (**24**), motrilin tri-metoximetilada (**25**) y squamocin tri-metoximetilada (**26**) (Fig. 4.11.) producen sobre *S. frugiperda*.

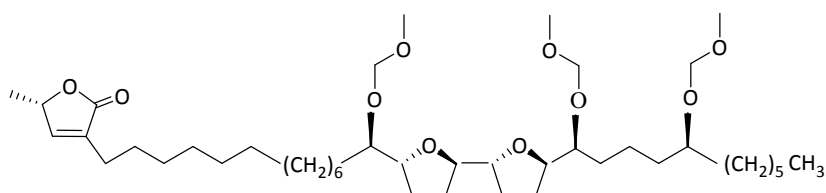
##### rolliniastatin-2 tri-metoximetilada (**24**)



##### Motrilin tri-metoximetilada (**25**)



##### squamocin tri-metoximetilada (**26**)



**Figura 4.11.** ACG bis-THF adyacentes metoximetiladas utilizadas en los ensayos sobre *S. frugiperda*.

El tratamiento a 100  $\mu\text{g/g}$  de la ACG **24**, añadida a la dieta de las larvas mostró efecto antialimentario  $\text{FR}_{50}=0,58\pm0,13$ , mientras que las ACG **25** y **26**, no mostraron efecto antialimentario,  $\text{FR}_{50}=0,98\pm0,19$  y  $0,95\pm0,15$ , respectivamente. Los compuestos **24**, **25** y **26** produjeron baja mortalidad larval y alta emergencia de adultos (Tabla 4.17.).

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

**Tabla 4.17.** Efectos antialimentarios y tóxicos de ACG bis-THF adyacentes metoximetiladas sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	FR <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Mortalidad larval (%)	Mortalidad pupal (%)	Emergencia de adultos (%)
rolliniastatin-2 tri-metoximetilada ( <b>24</b> )	0,58±0,13 <sup>b</sup>	40	0	60
motrilin tri-metoximetilada ( <b>25</b> )	0,98±0,19 <sup>a</sup>	5	5	90
squamocin tri-metoximetilada ( <b>26</b> )	0,95±0,15 <sup>a</sup>	15	0	85

\* Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

Las larvas alimentadas con dieta tratada con las ACG **24**, **25** y **26**, mostraron alto porcentaje de consumo, CI<sub>T</sub>/CI<sub>C</sub>=77±11%, 78±5% y 75±6. Las ACG **25** y **26**, mostraron marcada disminución en el crecimiento larval, GR<sub>T</sub>/GR<sub>C</sub>=53±7% y 51±8, como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa ECI<sub>T</sub>/ECI<sub>C</sub>=69±7% y 68±9%, respectivamente (Tabla 4.18.). La ACG **24**, no mostró alteraciones nutricionales con diferencias significativas con respecto al control.

**Tabla 4.18.** Efectos nutricionales de ACG bis-THF adyacentes metoximetiladas sobre *S. frugiperda*

Compuestos*	CI <sub>T</sub> /CI <sub>C</sub> (%)	GR <sub>T</sub> /GR <sub>C</sub> (%)	ECI <sub>T</sub> /ECI <sub>C</sub> (%)
rolliniastatin-2 tri-metoximetilada ( <b>24</b> )	77±11 <sup>a</sup>	76±15 <sup>a</sup>	99±21 <sup>a</sup>
motrilin tri-metoximetilada ( <b>25</b> )	78±5 <sup>a</sup>	53±7 <sup>b</sup>	69±7 <sup>b</sup>
squamocin tri-metoximetilada ( <b>26</b> )	75±6 <sup>a</sup>	51±8 <sup>b</sup>	68±9 <sup>b</sup>

\*Dosis del tratamiento: 100 µg por gramo de dieta; CI<sub>T</sub>/CI<sub>C</sub> (%): Índice de consumo, GR<sub>T</sub>/GR<sub>C</sub> (%): Índice de crecimiento. ECI<sub>T</sub>/ECI<sub>C</sub> (%): Índice de eficacia del consumo; <sup>a</sup>Media ± SEM. Valores dentro de una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes (P 0,05 test de rango múltiple de Tukey). Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

### 4.1.9. Discusión de los resultados de bioensayos en laboratorio

Los bioensayos en laboratorio con *S. frugiperda* nos permitieron concluir que:

- ) De los 3 subextractos, 13 ACG naturales y 13 semisintéticas estudiadas: squamocin y rolliniastatin-2 (MOM) presentaron efecto antialimentario.
- ) De las 17 ACG bis-THF adyacentes naturales y modificadas, 6 produjeron significativas alteraciones nutricionales, provocando efectos tóxicos en los primeros estadios larvales.
- ) Las ACG bis-THF adyacentes naturales produjeron mayor mortalidad que las ACG bis-THF no adyacentes naturales.
- ) Las ACG bis-THF adyacentes naturales produjeron mayor mortalidad que las ACG mono-THF.
- ) De los 3 subextractos estudiados el de *Annona squamosa* resultó el más tóxico.
- ) Las ACG naturales fueron tóxicas en los primeros estadios larvales, donde el lepidóptero produce el mayor daño en el cultivo.
- ) Las ACG acetiladas y las metoximetiladas provocaron alteraciones nutricionales y mortalidad en la etapa adulta del lepidóptero, sin dejar descendencia.

## 4.2. Resultados de los bioensayos a semicampo

Realizamos evaluaciones de la acción insecticida a mediana escala o semicampo, que simulaban condiciones de campo, a modo de verificar la eficacia real de los compuestos ensayados. Para realizar los bioensayos, elegimos los subextractos clorofórmicos, las ACG naturales y las ACG modificadas estructuralmente que mostraron la mayor actividad insecticida en los ensayos de laboratorio.

### 4.2.1. Evaluación de los efectos tóxicos

#### 4.2.1.1. Sub extractos clorofórmicos

Una vez cumplido el periodo de las 72 h, se evaluó el efecto que produjeron los subextractos clorofórmicos de *A. squamosa* (SE1), *A. montana* (SE2) y *A. muricata* (SE3), aplicados en tres concentraciones diferentes (250, 500 y 750 µg/mL). En todos los ensayos se empleó lambda-cihalotrina como control positivo a la dosis recomendada por el fabricante (250 µg/mL) y agua destilada más surfactante (1%) como control benigno. El tratamiento a 250 µg/mL de los subextractos clorofórmicos SE1, SE2 y SE3 aplicados sobre las hojas empleadas como dieta para las larvas, produjo con el subextracto SE1 mortalidad larval del 45%, mientras que con los subextractos SE2 y SE3 la mortalidad larval fue del 25% (Tabla 4.19.).

**Tabla 4.19.** Efectos tóxicos provocados por SE1, SE2 y SE3 sobre *S. frugiperda*

Compuestos [250 µg/mL]	Individuos muertos 24 h (%)	Individuos muertos 48 h (%)	Individuos muertos 72 h (%)
Lambda-cihalotrina	10	70	90
<i>A. squamosa</i> (SE1)	0	5	45
<i>A. montana</i> (SE2)	0	5	25
<i>A. muricata</i> (SE3)	0	0	25

\* Dosis lambda-cihalotrina: 250 µg/mL

\*Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control.

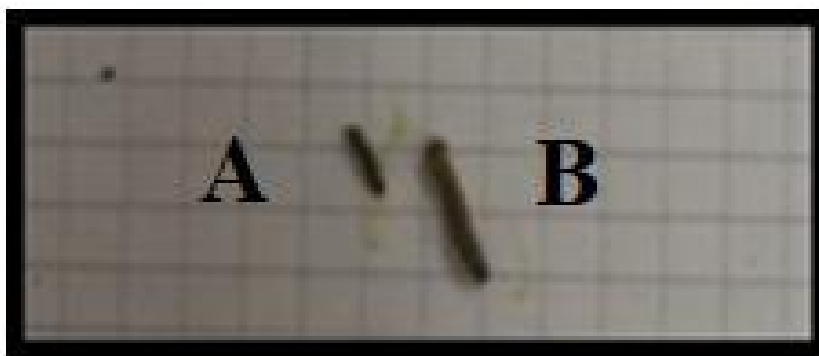
## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

La figura 4.12, muestra el daño foliar ocasionado por la larva durante el ensayo con el subextracto **SE1** a 250  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 4.12.** A: Inicio del ensayo; B: Final del ensayo: daño foliar con **SE1** a 250  $\mu\text{g/mL}$ .

Las larvas alimentadas con hojas tratadas con el extracto de *A. squamosa* (250  $\mu\text{g/mL}$ ) presentan una marcada disminución en el crecimiento larval con respecto a las larvas control (Fig. 4.13.), como así también, ineficiencia en la conversión de los nutrientes absorbidos en biomasa. Este resultado sería consistente con una intoxicación crónica que lleva a la muerte.



**Figura 4.13.** A: Larvas tratadas con extracto de *A. squamosa* (250 $\mu\text{g/mL}$ ); B: Larvas control.

El tratamiento a 500  $\mu\text{g/mL}$  de los subextractos clorofórmicos **SE1**, **SE2** y **SE3** mostró que el subextracto **SE1** a las 72 h produjo una mortalidad larval del 60%, mientras los subextractos **SE2** y **SE3** no produjeron mortalidad larval significativa en el mismo periodo (35% y 40%, respectivamente), como se muestra en la Tabla 4.20.

**Tabla 4.20.** Efectos tóxicos provocados por **SE1**, **SE2** y **SE3** sobre *S. frugiperda*

Compuestos [500 µg/mL]	Individuos muertos 24 h (%)	Individuos muertos 48 h (%)	Individuos muertos 72 h (%)
Lambda-cihalotrina*	10	70	90
<i>A. squamosa</i> ( <b>SE1</b> )	0	15	60
<i>A. montana</i> ( <b>SE2</b> )	0	5	35
<i>A. muricata</i> ( <b>SE3</b> )	0	5	40

\* Dosis lambda-cihalotrina: 250 µg/mL

\*Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

El tratamiento a 750 µg/mL de los subextractos clorofórmicos **SE1**, **SE2** y **SE3** mostró que el subextracto **SE1** a las 72 h produjo una mortalidad larval del 65%, mientras los subextractos **SE2** y **SE3** produjeron una mortalidad larval de 40% y 50%, respectivamente como se muestra en la Tabla 4.21.

**Tabla 4.21.** Efectos tóxicos provocados por **SE1**, **SE2** y **SE3** sobre *S. frugiperda*

Compuestos [750 µg/mL]	Individuos muertos 24 h (%)	Individuos muertos 48 h (%)	Individuos muertos 72 h (%)
Lambda-cihalotrina*	5	85	100
<i>A. squamosa</i> ( <b>SE1</b> )	0	10	65
<i>A. montana</i> ( <b>SE2</b> )	0	10	40
<i>A. muricata</i> ( <b>SE3</b> )	0	15	50

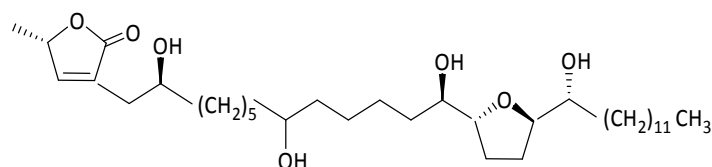
\* Dosis lambda-cihalotrina: 250 µg/mL

\*Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control

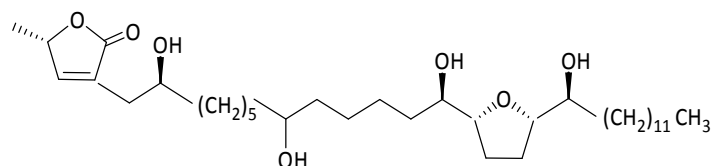
#### 4.2.1.2. Acetogeninas anonáceas naturales y modificadas estructuralmente

Para realizar los bioensayos a semicampo se seleccionaron las ACG naturales y semisintéticas que presentaron la mayor toxicidad en los bioensayos de laboratorio a 100  $\mu\text{g/g}$  de dieta. Ellas fueron: annonacin (1), *cis*-annonacin (2), rolliniastatin-2 (3) y squamocin (4) y las acetilada y metoximetilada: squamocin tri-acetilada (5) y squamocin tri-metoximetilada (6), respectivamente (Fig. 4.14.).

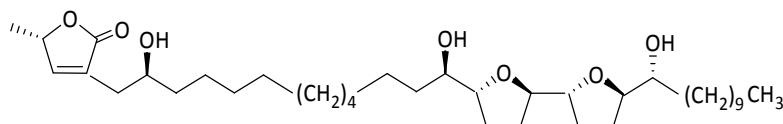
##### annonacin (1)



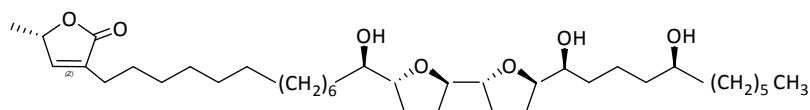
##### *cis*-annonacin (2)



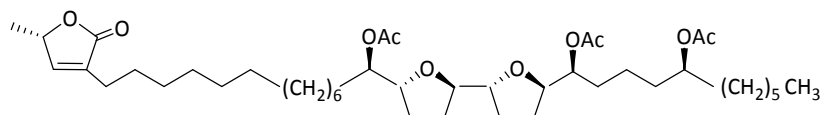
##### rolliniastatin-2 (3)



##### squamocin (4)



##### squamocin tri-acetilada (5)



##### squamocin tri-metoximetilada (6)

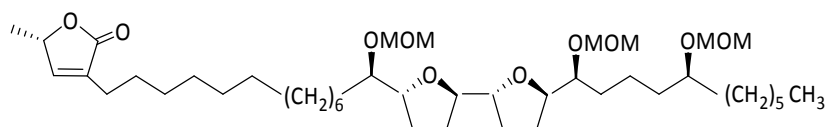


Figura 4.14. ACG naturales y semisintéticas empleadas en los ensayos con *S. frugiperda*.



## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

En la Tabla 4.22, se muestran los resultados de los efectos tóxicos que provocan sobre *S. frugiperda* el tratamiento en hojas de maíz con las ACG **1, 2, 3, 4, 5 y 6**. En todos los ensayos se usó lambda-cihalotrina como control positivo a 250 µg/mL y agua destilada más surfactante (1%) como control benigno.

El tratamiento con 100 µg/mL de las ACG **1, 2, 3, 4, 5 y 6** mostró que las ACG naturales **1, 2, 3 y 4** produjeron a las 72 h la mayor mortalidad larval, entre 65-55% y las ACG semisintéticas **5 y 6** (35% y 25%, respectivamente), como se muestra en la Tabla 4.22.

**Tabla 4.22.** Efectos tóxicos provocados por las ACG **1, 2, 3, 4, 5 y 6** sobre *S. frugiperda*

Compuestos [100 µg/mL]	Individuos muertos 24 h (%)	Individuos muertos 48 h (%)	Individuos muertos 72 h (%)
Lambda-cihalotrina*	5	85	100
annonacin ( <b>1</b> )	0	0	60
cis-annonacin ( <b>2</b> )	0	0	55
rolliniastatin-2( <b>3</b> )	0	0	65
squamocin ( <b>4</b> )	0	0	55
squamocin tri-acetilada ( <b>5</b> )	0	0	35
squamocin tri- metoximetilada ( <b>6</b> )	0	0	25

\* Dosis Lambda-cihalotrina: 250 µg/mL

\*Para fines comparativos los resultados se expresan como una relación entre el tratamiento y control.

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

En la Tabla 4.23, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los ensayos a semicampo, que nos permitió seleccionar la concentración del subextracto y producto natural más tóxico sobre *S. frugiperda*: *A. squamosa* (250 µg/mL) y rolliniastatin-2 (100 µg/mL).

**Tabla 4.23.** Resultados de los ensayos a semicampo

Compuestos	Concentración [µg/mL]	Individuos muertos 24 h (%)	Individuos muertos 48 h (%)	Individuos muertos 72 h (%)
<b>A</b>	250	0	5	45
	500	0	15	60
	750	0	10	65
<b>B</b>	250	0	5	25
	500	0	5	35
	750	0	10	40
<b>C</b>	250	0	0	25
	500	0	5	40
	750	0	15	50
<b>D</b>	100	0	0	60
<b>E</b>	100	0	0	55
<b>F</b>	100	0	0	65
<b>G</b>	100	0	0	55
<b>H</b>	100	0	0	35
<b>I</b>	100	0	0	25
<b>J</b>	250	10	80	95

Subextractos. **A:** *A. squamosa*, **B:** *A. montana*, **C:** *A. muricata*, ACG naturales. **D:** annonacin, **E:** *cis*-annonacin, **F:** rolliniastatin-2, **G:** squamocin, ACG modificadas. **H:** squamocin tri-acetilada, **I:** squamocin tri-metoximetilada, Insecticida comercial. **J:** lambda-cihalotrina.

### 4.3. Concentraciones óptimas y formulación

Dado que los productos naturales aisladamente presentan propiedades fitosanitarias menos tóxicas que los comerciales y en la búsqueda de optimizar la concentración y proponer la formulación de un insecticida selectivo para *S. frugiperda*, evaluamos la

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

capacidad de control del insecto con mezclas de los productos naturales y el producto comercial.

En este sentido, realizamos ensayos con formulaciones obtenidas de la mezcla de lambda-cihalotrina, subextracto clorofórmico de *A. squamosa* y ACG naturales. Los bioensayos se llevaron a cabo empleando lambda-cihalotrina como control positivo y agua destilada más surfactante (1%) como control benigno.

En la tabla 4.24, se observa que la mezcla de 125  $\mu\text{g/mL}$  de subextracto de *A. squamosa* con 125  $\mu\text{g/mL}$  de lambda-cihalotrina produjo mortalidad larval del 80% a las 72 h.

Asimismo, se observa que el tratamiento con la mezcla de 100  $\mu\text{g/mL}$  de rolliniastatin-2 y 125  $\mu\text{g/mL}$  de lambda-cihalotrina, produjo mortalidad larval del 90% en las mismas condiciones experimentales y que al reducir la dosis de rolliniastatin-2 a 50  $\mu\text{g/mL}$  la formulación produjo 75% de mortalidad larval.

La mezcla de squamocin a 100  $\mu\text{g/mL}$  + rolliniastatin-2 a 100  $\mu\text{g/mL}$  + lambda-cihalotrina a 50  $\mu\text{g/mL}$ , provocó mortalidad larval del 100%.

Los resultados indican que se puede lograr el control de las larvas de *S. frugiperda*, disminuyendo significativamente la dosis del insecticida comercial a la quinta parte de la recomendada por el fabricante (50  $\mu\text{g/mL}$ ), formulando mezclas con dosis muy bajas de ACG naturales (100  $\mu\text{g/mL}$ ).

## RESULTADOS DE LOS BIENSAYOS EN LABORATORIO Y A SEMICAMPO

**Tabla 4.24.** Efectos tóxicos de las distintas formulaciones sobre *S. frugiperda*

Concentración	Individuos muertos 24 h (%)	Individuos muertos 48 h(%)	Individuos muertos 72 h(%)
lambda-cihalotrina 250 $\mu$ g/mL	20	80	100
lambda-cihalotrina 125 $\mu$ g/mL	15	40	60
<i>A. squamosa</i> (SE1) 250 $\mu$ g/mL	0	5	45
<i>A. squamosa</i> (SE1) 125 $\mu$ g/mL+lambda- cihalotrina125 $\mu$ g/mL	5	35	80
<i>A. squamosa</i> (SE1) 125 $\mu$ g/mL +lambda-cihalotrina 50 $\mu$ g/mL	0	25	65
rolliniastatin-2 100 $\mu$ g/mL	0	0	65
rolliniastatin-2 100 $\mu$ g/mL + lambda-cihalotrina 125 $\mu$ g/mL	15	60	90
rolliniastatin-2 50 $\mu$ g/mL + lambda-cihalotrina 125 $\mu$ g/mL	5	40	75
rolliniastatin-2 50 $\mu$ g/mL + lambda-cihalotrina 50 $\mu$ g/mL	0	10	65
squamocin 100 $\mu$ g/mL	0	0	55
squamocin 100 $\mu$ g/mL + lambda- cihalotrina 125 $\mu$ g/mL	10	55	85
squamocin 50 $\mu$ g/mL + lambda- cihalotrina 125 $\mu$ g/mL	5	35	80
squamocin 50 $\mu$ g/mL + lambda- cihalotrina 50 $\mu$ g/mL	0	5	45
squamocin 100 $\mu$ g/mL + rolliniastatin-2 100 $\mu$ g/mL + lambda-cihalotrina 50 $\mu$ g/mL	15	80	100
squamocin 50 $\mu$ g/mL + rolliniastatin-2 50 $\mu$ g/mL + lambda-cihalotrina 50 $\mu$ g/mL	0	35	75

### 4.3.1. Discusión de los resultados de bioensayos a semicampo

Los bioensayos a semicampo con *S. frugiperda* nos permitieron concluir que:

- La concentración óptima de la lambda-cihalotrina fue de 250  $\mu\text{g/mL}$ , si se aplica pura.
- La concentración óptima del subextracto de *A. squamosa* fue de 250  $\mu\text{g/mL}$ , si se aplica sólo.
- La concentración óptima de la rolliniastatin-2 fue de 100  $\mu\text{g/mL}$ , si se aplica pura.
- La concentración óptima de la squamocin fue de 100  $\mu\text{g/mL}$ , si se aplica pura.
- Las formulaciones óptimas binaria y ternaria para el control de las larvas serían:

**rolliniastatin-2 100  $\mu\text{g/mL}$  + lambda-cihalotrina 125  $\mu\text{g/mL}$**

**squamocin 100  $\mu\text{g/mL}$  + rolliniastatin-2 100  $\mu\text{g/mL}$  + lambda-cihalotrina 50  $\mu\text{g/mL}$**

**“Las mezclas permiten disminuir significativamente la dosis de aplicación y la concentración del insecticida comercial y aumentar significativamente el efecto insecticida de los productos naturales”**

## 5. Estudios Estructurales Teóricos de motrilin y squamocin

### 5.1. Espectros teóricos FT-IR y FT-Raman de ACG naturales

Las ACG  $\alpha$ -metil  $\gamma$ -lactonas,  $\alpha$ -insaturadas, motrilin y squamocin son productos naturales conocidos desde hace mucho tiempo y poseen en sus estructuras anillos bis-THF y largas cadenas laterales que contienen grupos  $-\text{CH}_2$ . Todos los estudios relacionados con las ACG son útiles e interesantes porque presentan una variedad de actividades biológicas, tales como, insecticidas, antimicrobianas y citotóxicas, entre otras (Cortes y col., 1991; Bombasaro y col., 2011; Chen y col., 2012; Attiq y col., 2017; Ruiz Hidalgo y col., 2016); así como, por sus relaciones estructura-actividad frente a células tumorales humanas (Yang y col., 2009; Hong y col., 2016, 2017). Sin embargo, nuestro grupo reportó recientemente que dos ACG rolliniastatin-1 y motrilin, son inhibidores de la corrosión del acero al carbono en soluciones ácidas (Álvarez y col., 2018). Estas importantes y diferentes actividades que presentan las ACG, son un motivo poderoso para estudiar sus propiedades estructurales y vibracionales debido a que, hasta ahora, no fueron reportadas. El conocimiento de algunas propiedades estructurales de los grupos tetrahidrofuranos de estos compuestos es de interés para comprender por qué estas ACG presentan propiedades muy diferentes a pesar de que estructuralmente tienen grupos similares. A la fecha, los espectros de Infrarrojo y Raman de motrilin y squamocin, no se reportaron y sólo se publicaron algunos estudios teóricos y experimentales relacionados con las interacciones de ACG con bicapas lipídicas artificiales mediante el uso de espectros Infrarrojos (Bombasaro y col., 2004).

Asimismo, dado los resultados experimentales obtenidos de la acción insecticida de squamocin y motrilin, nos propusimos conocer la estabilidad y reactividad de estas moléculas. En este sentido, los objetivos fueron modelar y luego optimizar teóricamente sus estructuras: (i) para calcular algunas propiedades estructurales; (ii) para calcular las frecuencias y predecir los espectros vibracionales con la finalidad de realizar las asignaciones correspondientes de las principales bandas observadas experimentalmente; (iii) para calcular los orbitales fronteras y descriptores globales, a fin de predecir las reactividades y comportamientos de estas dos ACG y, finalmente; (iv) para comparar sus propiedades con otras moléculas que contienen grupos similares de anillos THF, lactonas, OH y  $\text{CH}_2$  (Bichara y col., 2010; Chain y col., 2017). Estos estudios estructurales teóricos

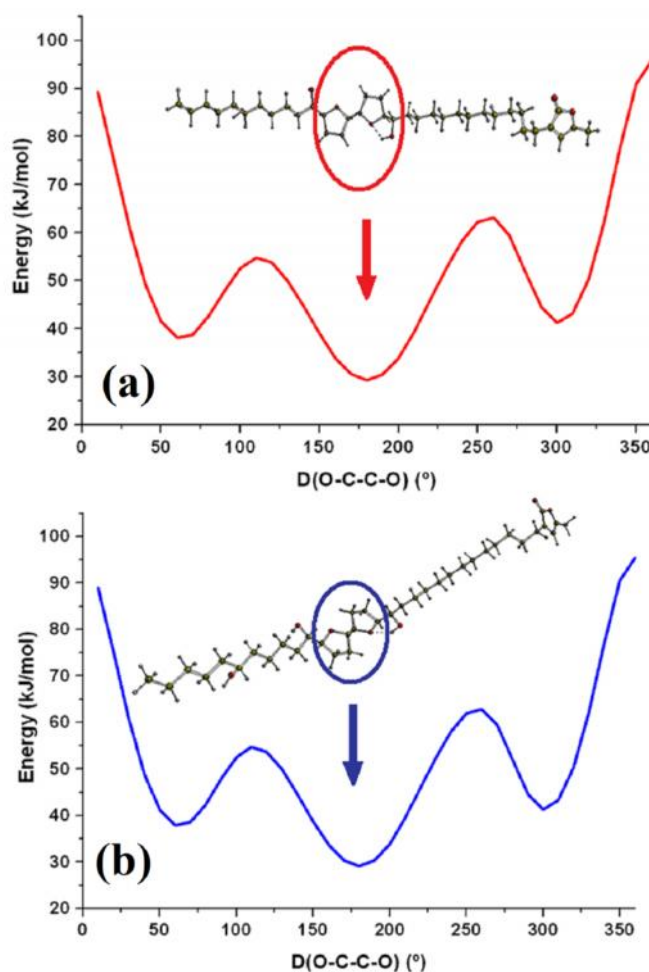
se llevaron a cabo con el método híbrido B3LYP (Becke 1988; Lee y col., 1988) utilizando el limitado conjunto de funciones base 6-31G\* debido al alto costo computacional que implican estos cálculos porque ambas ACG son especies con un número elevado de átomos de C (109 en total), mientras que las asignaciones de sus modos normales de vibración principales se realizaron con la ayuda del programa *GaussView*.

### 5.2. Técnicas de caracterización

Las ACG se caracterizaron mediante los espectros de FT-IR y FT-Raman. Los espectros FTIR de ambas ACG en estado sólido se registraron en pastillas de KBr en un espectrofotómetro Perkin Elmer GX provisto de un detector DTGS constantemente purgado con aire seco. Los espectros se adquirieron entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  con un total de 256 exploraciones acumuladas y una resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros Raman de ambas muestras en estado sólido a temperatura ambiente se registraron en un rango de 3500-50  $\text{cm}^{-1}$  utilizando un microscopio DRX Raman de ThermoScientific equipado con un láser (línea de excitación de 1532 nm, 10 mW de potencia de láser). El espectro Raman se registró con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 300 exploraciones.

### 5.3. Detalles computacionales

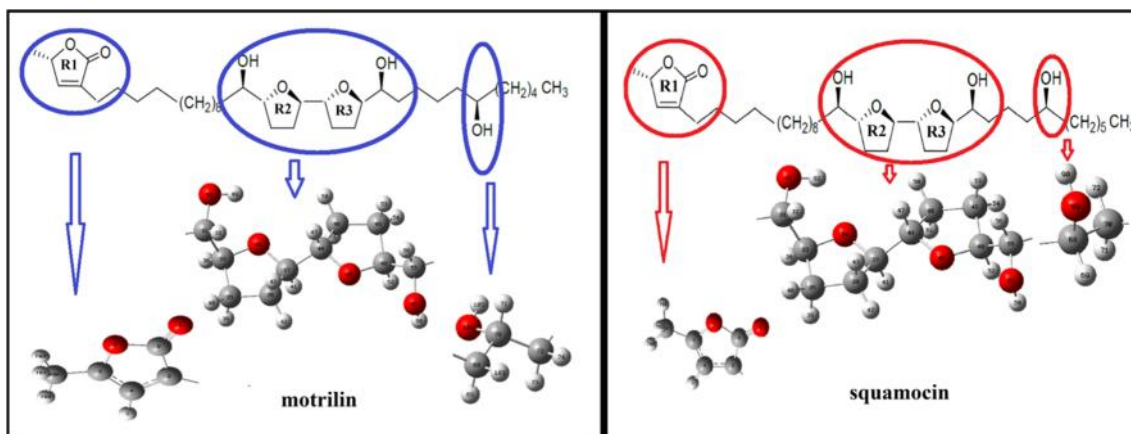
Las estructuras de motrilin y squamocin se modelaron previamente con el programa *GaussView* (Nielsen y col., 2008) y luego se optimizaron las dos moléculas en fase gaseosa con el método híbrido B3LYP/6-31G\* (Becke 1988; Lee y col., 1988) utilizando el programa *Gaussian 09* (Frisch y col., 2009). De la gráfica se observaron en ambos casos tres estructuras estables donde sólo una de ellas presenta el mínimo global, como se observa en la Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Superficies de Energía Potencial: a) squamocin y b) motrilin.

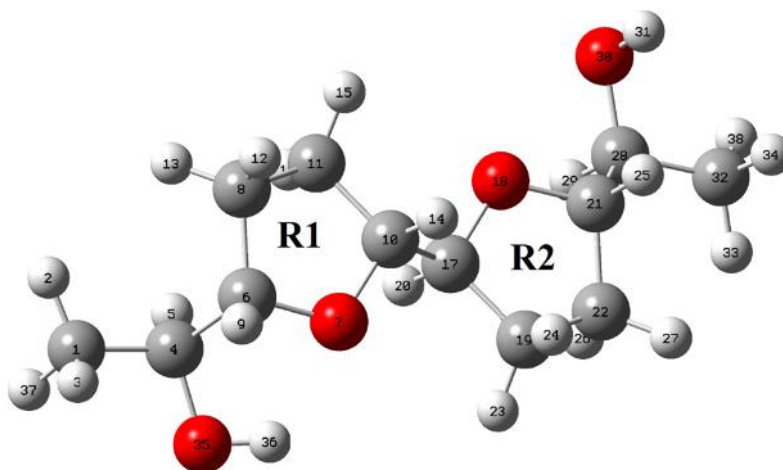
Por lo tanto, en este trabajo solo se estudiaron las propiedades de estas conformaciones más estables de motrilin y squamocin cuyas estructuras se pueden ver en la Figura 5.2. Las estructuras de ambas ACG son muy similares entre ellas y sólo difieren en la posición del grupo OH unido a la cadena lateral  $-(CH_2)_5-CH_3$  y  $-(CH_2)_4-CH_3$  de squamocin y motrilin, respectivamente. Debido al alto número de átomos en squamocin y motrilin con un total de 109 y a sus elevados costos computacionales, se empleó el conjunto de funciones bases 6-31G \* para realizar todos los cálculos. Por el alto número de átomos que presentan ambas estructuras, para facilitar su estudio, sus estructuras se simplificaron. Por lo tanto, el análisis vibracional se realizó para una estructura común que contiene un total de 38 átomos y los dos anillos R2 y R3 porque es la parte común de ambas estructuras. Esta estructura se optimizó y se realizaron sus análisis vibracionales.





**Figura 5.2.** Estructura molecular teórica de los conformeros más estables.

La estructura simplificada denominada (M) se puede ver en la Figura 5.3. Las asignaciones de las bandas principales observadas en los espectros vibracionales de ambas ACG se realizaron por comparación de sus espectros IR y Raman experimentales (Fig. 5.4.) con los correspondientes predichos y, por supuesto, con los espectros IR y Raman predichos para la estructura M simplificada (Fig. 5.5.). Luego, sus propiedades se compararon entre ellas y también con los resultados obtenidos para M y con otras especies que contienen grupos similares en sus estructuras.



**Figura 5.3.** Estructura molecular teórica de la estructura simplificada M.

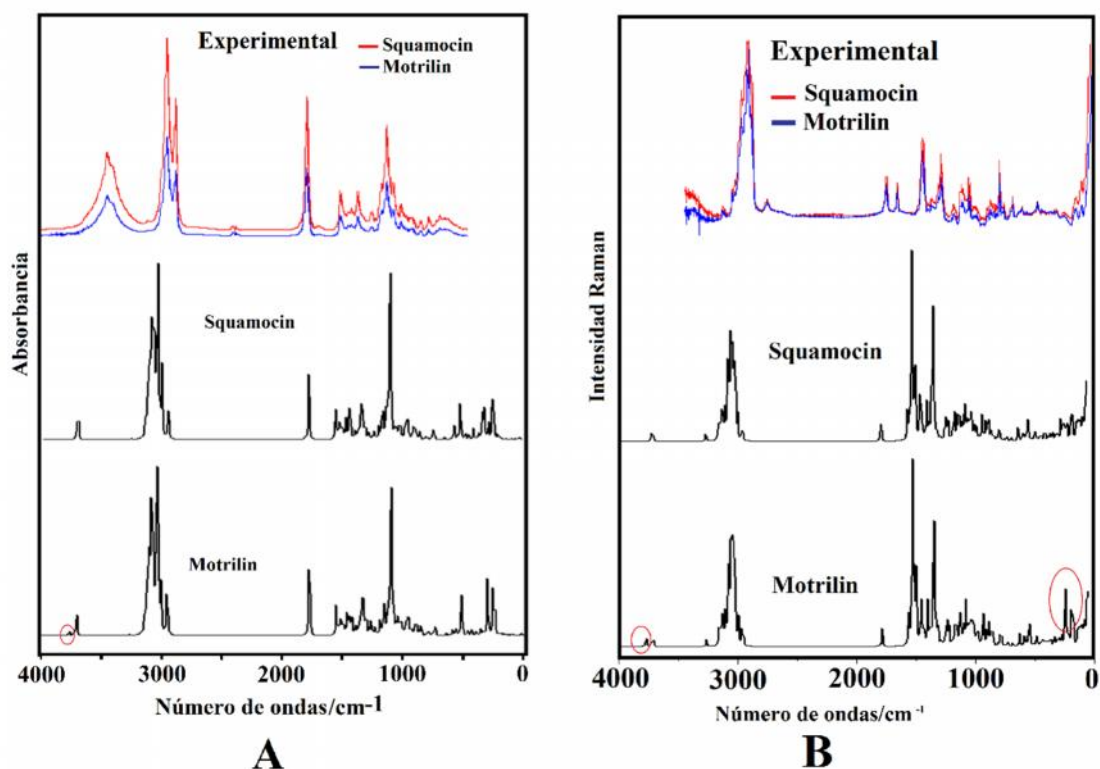


Figura 5.4. A: Espectro Infrarrojo experimental; B: Espectro Raman experimental

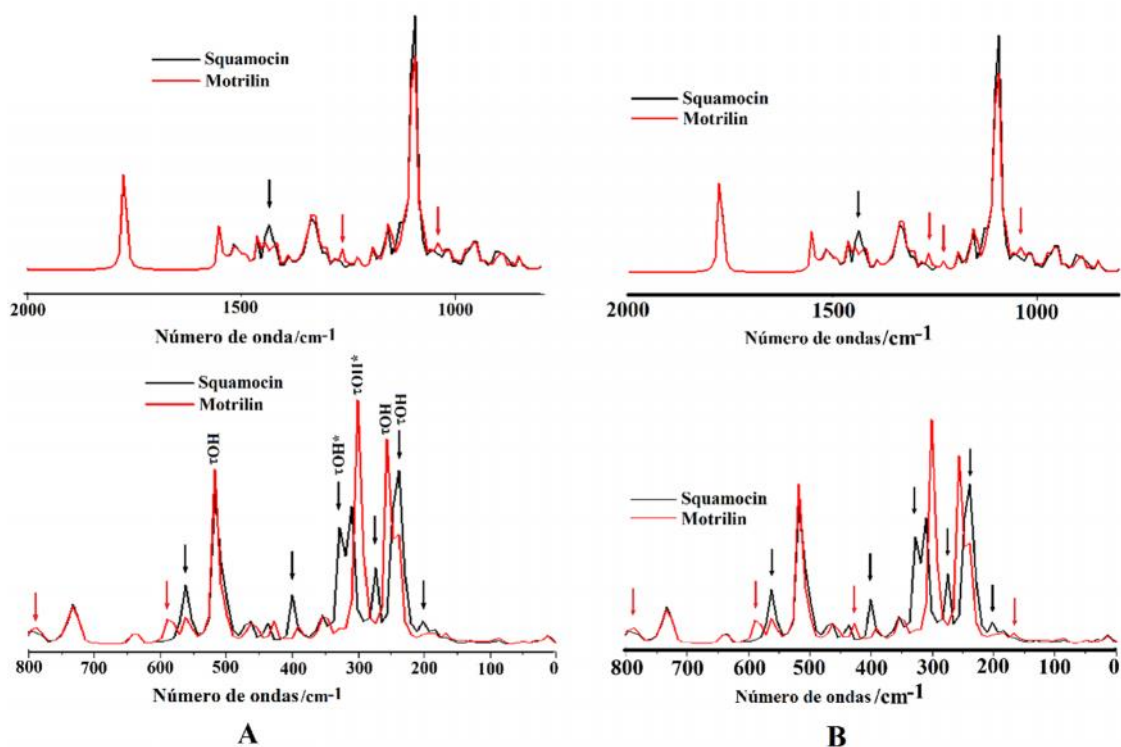


Figura 5.4. A: Espectro Infrarrojo teórico; B: Espectro Raman teórico

## 5.4. Conclusiones

Se caracterizaron dos ACG, motrilin y squamocin, utilizando sus espectros de IR y Raman. Ambas ACG tienen el mismo número de átomos, pero squamocin es diferente de motrilin porque un grupo OH está enlazado al grupo  $-(CH_2)_5-CH_3$ , mientras que en motrilin el grupo OH está unido al grupo  $-(CH_2)_4-CH_3$ . Las bandas principales observadas en los espectros vibracionales de ambas ACG se asignaron combinando sus espectros predichos mediante el uso de los cálculos B3LYP/6-31G\* con los experimentales correspondientes y con la ayuda de una estructura simplificada. Aquí, las comparaciones con la estructura simplificada sugieren que las altas estabilidades de estas dos ACG pueden atribuirse a los anillos de lactona en sus estructuras. Las proximidades entre sus orbitales fronteras HOMO-LUMO revelan que motrilin es ligeramente más reactiva que squamocin y, por lo tanto, las posiciones de los grupos OH en la cadena lateral influyen en sus reactividades y comportamientos.

## 6. Conclusiones

Mediante el estudio químico de tres subextractos clorofórmicos del género *Annona*, se aislaron e identificaron 18 ACG naturales; 1 nueva y 17 conocidas. Se realizaron modificaciones estructurales de 9 ACG mayoritarias y con potencial acción insecticida sobre *Spodoptera frugiperda*. De entre las seleccionadas, 5 ACG naturales y 3 modificadas resultaron ser las más tóxicas. Estos

Los resultados obtenidos en laboratorio y a semicampo mostraron porcentajes de mortalidad similares.

Las bis-THF ACG naturales presentaron mayor toxicidad frente a *Spodoptera frugiperda* que las mono-THF naturales.

La acción insecticida disminuye cuando los grupos OH se encuentran protegidos por la presencia de grupos acetilos (OAc) o bloqueados con grupos metoximetilos (MOM).

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que los requerimientos moleculares de las ACG para diseñar derivados sintéticos selectivos en su acción insecticida están relacionados con la presencia de los grupos OH flanqueantes a los anillos bis-THF.

**La presencia en las ACG de grupos OH flanqueantes a los anillos bis-THF es el  
“requerimiento molecular indispensable para diseñar derivados sintéticos  
selectivos en su acción insecticida sobre *Spodoptera frugiperda*”**

### 6.1. Proyecciones

La gran variedad y cantidad de ACG presentes en los subextractos clorofórmicos y sus posibles nuevas aplicaciones como insecticidas de bajo impacto ambiental, hace necesario continuar con el aislamiento, purificación y elucidación estructural de las mismas.

Continuar con la caracterización estructural y espectroscópica de otras ACG mediante estudios teóricos computacionales.

Realizar el estudio histológico de larvas de *Spodoptera frugiperda*.

## 7. Bibliografía

**Acosta, D. E.**

Relación entre Índice de Área Foliar y Rendimiento en Frijol bajo condiciones de Secano. INIFAP. Nuevo León Mex. (2008).

**Ahammaadsahib, K. I., Hollingworth, R. M., McGovren, J. P., Hui, Y. H. and McLaughlin, J.L.**

Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal Annonaceous acetogenin. *Life sciences*, **53**, 1113-1120. (1993).

**Al-Sarar, A., Hall, F. R., Downer, R. A.**

Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Pest Management Science* **62**, 1023–1031. (2006).

**Alali, F.Q., Liu, X.X. and Mc Laughlin, J.L.**

Annonaceus acetogenins: Recent progress. *Journal of Natural Products*, **62**, 504-540. (1999)

**Alkofahi, J., Rupprecht, J.K., Anderson, J.E., McLaughlin, J.L., Mikolajczak, K.L., Scott, B.A.**

“Insecticides of Plant Origin.” Ed: Arnason, J.T., Philogéne, B.J.R., Morand, P. ACS symposium Series 387. Washington, DC. pp. 25. (1989)

**Alonso Álvarez, R.**

Reseña histórica y aspectos bioecológicos del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). In *Memorias Seminario Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Ed: Zuluaga, J. L. Muñoz, G. Calí, Colombia **96**, 12-14. (1991).

- Alvarez, P. E., Fiori-Bimbi, M. V., Neske, A., Brandán, S. A., Gervasi, C. A.**  
Rollinia occidentalis Extract as Green Corrosion Inhibitor for Carbon Steel in HCl Solution, *J. of Industrial and Engineering Chemistry*. **58**, 92-99. (2018).
- Álvarez Colom, O., Neske, A., Popich, S., Bardón, A.**  
Bioactive annonaceous acetogenins from *Annona Montana* (Annonaceae). *Biocell* **29**, 74. (2005).
- Álvarez Colom, O., Neske, A., Popich, S., Bardón, A.**  
Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science* **80**, 63-67. (2007).
- Álvarez Colom, O., Barrachina, I., Ayala Mingol, I., Gonzalez Mas, M.C., Moya Sanz, P., Neske, A., Bardón, A.**  
Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Pest Science*, **81**, 85-89. (2008).
- Anzola, L.**  
Índice agropecuario. 25 Edición. Maracay, Venezuela B: 24. (2000).
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. Reduca.**  
Serie Fisiología Vegetal. **2**, 119-145. (2009)
- Ascher, S.K.R.**  
Non conventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Arch. Insect. Physiol.* **22**, 433-449. (1993).
- Attig, A., Jalil, J., Husain, K.**  
Annonaceae: Breaking the Wall of Inflammation, *Frontiers in Pharmacology*, **8**, 752. (2017).

**Balandrin, M., Klocke, J.A.**

Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. **228**, 1154-1160. (1985).

**Barrachina, I., Neske, A., Granell, S., Bermejo, A., Chahaboune, N., El Aoued, N., Álvarez Colom, O., Bardón, A., Zafra Polo M.**

Tucumanin, a  $\alpha$ -Hydroxy  $\alpha$ -Lactone bistetrahydrofuranic acetogenin from *Annona cherimolia*, Potent Inhibitor of Mitochondrial Complex I. *Planta Médica* **70**, 866-868 (2004).

**Berenbaum, M.B., Rosenthal, G.A.**

*Plant Secondary Metabolites: Vol. 1. The Chemical Participants*. Academic Press, New York. (1992).

**Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E., Cortés, D.**

Acetogenins from Annonaceae: Recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Reports*, **22**, 269-303. (2005)

**Bobadilla, M., Zavaleta, G., Gil, F., Pollack, L., Sisniegas M.**

Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona muricata* Miller «chirimoya» y *A. muricata* Linneaus «guanábana» sobre larvas del IV estadio de *Anopheles sp.* *Revista Peruana de Biología*. **9**, 64-73. (2002).

**Bombasaro, J. A., Di Toto Blessing, L., Diaz, S., Neske, A., Suvire, F. D., Enriza, R. D., Rodríguez, A. M.**

Theoretical and experimental study of the interactions of annonaceous acetogenins with artificial lipid bilayers, *Journal of Molecular Structure* **1003**, 87–91. (2011).

**Boulter, D.**

Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochem.* **34**, 1453-1466. (1993).



**Capinera, J.L.**

Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae), *Institute of Food and Agricultural Science. University of Florida*. Publication Number EENY-98. (1999).

**Castillo-Sánchez, L. H. C.; Jiménez-Osornio, J. J.; Delgado-Herrera, M. A.**

Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Yucatán. **12**, 445-462. (2010).

**Cavé, A., Figadère, B., Laurens, A., Cortes, D.**

Acetogenins from Annonaceae in: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer-Verlag, Wien, **70**, 81-288. (1997)

**Chaves, M. H., Roque, N. F.**

Amides and lignanamides from *Porcelia macrocarpa*. *Phytochemistry* **44**, 523. (1997).

**Chen, Y., Chen, J. W., Li, X.**

Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*, *Phytochemistry Letters* **5**, 33–36. (2012).

**Clavijo, S., Pérez Greiner, G.**

Protección y sanidad vegetal (capítulo 6), Insectos plagas del maíz (sección 2). En: Fontana Nieves, H. y C. González Narváez (eds.), Fundación Polar, Caracas, Venezuela, 345-361. (2000).

**Cornell, H.V., Hawkins B.A.**

Herbivore responses to plant secondary compounds: A test of phytochemical coevolution theory. *The American naturalist* **161**, 507-522.(2003).

**Cortes, D., Figadère, B., Cavé, A.**

Bis-tetrahydrofuran acetogenins from annonaceae. *Phytochemistry*, **32**, 1467-1473. (1993).

**Cortes, D., Myint, S.H., Hocquemiller, R.**

Molvizarin and motrilin: Two novel cytotoxic bis-tetrahydro-furanic  $\gamma$ -lactone acetogenins from *Annona cherimolia*. *Tetrahedron*. **47**, 8195-8202. (1991a).

**Cortes, D., Myint, S.H., Leboeuf, M., Cave, A.**

A new type of cytotoxic acetogenins: the tetrahydrofuranic  $\gamma$ -hydroxy methyl  $\gamma$ -lactones. *Tetrahedron Letters*. **32**, 6133-6134. (1991b).

**De Liñan, V. C., De Liñan C. C..**

Vadémecum de Agroquímicos de México. 1.<sup>a</sup> edición. Editorial Tecno agrícola de México S. A. de C. V. México. (2009).

**Deverall, B.J.**

*Defence mechanisms of plants*. Cambridge University Press. (1979).

**Dixon, R. A.**

Natural products and plant disease resistance. *Nature*. **411**, 843-847. (2001).

**Enciso, B.E. y C. Gómez.**

Comparación de las respuestas de cuatro cultivares de mora (*Rubus* sp.) a las variaciones del factor luz. *Agronomía Colombiana* **22**, 46-52. (2004)

**Fang, X. P., Rieser, M. J., Gu, Z. M., Zhao, G. X. and McLaughlin, J. L.**

Annonaceous acetogenins: an updated review. *Phytochemical Analysis*, **4**, 27-48. (1993).

**Fang, X.P., Song, R., Gu, Z.M., Rieser, M.J., Miesbauer, D.L., Mc Laughlin, J.L.**

A new type of cytotoxic annonaceous acetogenin: giganin from *Goniothalamus giganteus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **3**, 1153-1156. (1993)

**Feeny, P.**

The evolution of chemical ecology: Contributions from the study of herbivorous insects. pp 1-35 en: *Herbivores. Their interaction with Secondary Plant Metabolites*. Rosental, G.A., Berenbaum, M.R. (eds.), Academic Press, New York. (1992).

**Fernández, R.**

Plagas de gramíneas. Guía de Protección Vegetal I. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. pp: 155-171. (1991).

**Fontana, J., Lancas, F., Pasos, M., Cappelaro, E., Villegas, J., Baron, M., Nosedá, M., Pomilio, M., Vitale, A., Webber, A., Maul, A., Peres, W. y Foerster, L.**

Selective Polarity and adsorption guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **70**, 67-76. (1998).

**Fries, R.E.**

Revision der Arten einiger Annonaceen-Gattungen. *Acta Horti Bergiani*. **12**: 165-170. (1934).

**Fujimoto, Y., Eguchi, T., Kakinuma, K., Ikekawa, N., Sahai, M., Gupta, Y. K., Eguchi, T., Ikekawa, N.**

squamocin, a new cytotoxic bis-tetrahydrofuran containing acetogenin from *Annona squamosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **36**, 4802-4806. (1988).

**Fujimoto, Y., Murasaki, C., Kakinuma, k., Eguchi, T., Ikekawa, N., Furuya, M., Hirayama, K., Ikekawa, T., Sahai, M., Gupta, Y. K., Ray, A.B.**

Squamostatin-A: Unprecedented bis-tetrahydrofuran acetogenin from *Annona squamosa*. *Tetrahedron Letters*. **31**, 535-538. (1990)

**Gleye, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., Figadère, B. And Cavé, A.**

Muridienin-1 and 2: the missing links in the biogenetic precursors of acetogenins of Annonaceae. *Tetrahedron Letters*, **37**, 9301-9304. (1996).

**Gu, Z.M., Fang, X. P., Rieser, M. J., Hui, Y. H., Miesbauer, L.R., Smith, D. L., Wood, K. V., McLaughlin, J. L.**

New cytotoxic annonaceous acetogenins: Bullatanocin and cis- and trans-Bullatanocinone, from *Annona bullata* (Annonaceae). *Tetrahedron*. **49**. 747-754. (1993)

**Gu, Z.M., Zhao, G.X., Oberlies, N.H., Zeng, L., Mc Laughlin, J.L.**

Annonaceous acetogenins, *Phytochemistry of Medicinal Plants*, Plenum Press, **29**, 249-310. (1995)

**Guadaño, A., Gutierrez, C., De La Peña, E., Cortes, D., Gonzalez-Coloma, A.**

Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. *Journal Natural Products*, **63**, 773-776. (2000).

**Hansen, M.C., R.S. DeFries, J.R. Townshend, M. Carroll, C. Dimiceli and R.A. Sohlberg.**

Global percent tree cover at a spatial resolution of 500 meters: First results of the MODIS vegetation continuous fields algorithm. *Earth Interactions* **7**: 1-15. (2003).

**Harborne, J.B.**

*Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, New York. (1982).

**Hardke, J. T., Temple, J. H., Leonard, B. R., Jackson, R. E.**

Laboratory Toxicity and Field Efficacy of Selected Insecticides Against Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomological Society* **94**, 272-278. (2011).

**He, K., Zeng, L., Ye, Q., Shi, G., Oberlies, N., Zhao, G., Njoku, C., McLaughlin, J.L.**

Comparative SAR evaluations of annonaceous acetogenins for pesticidal activity. *Pesticide Science*, **49**, 372-378. (1997).

**Hong, J., Li, Y., Xiao, Y., Li, Y., Guo, Y., Kuang, H., Wang, X.**

Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **145**, 319–327. (2016).

**Hong, J., Sun, Z., Li, Y., Guo, Y., Liao, Y., Liu, M., Wang X.**

Folate-modified Annonaceous acetogenins nanosuspensions and their improved antitumor efficacy, *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 5053-5067. (2017).

**Hoye, T. R., Suhadolnik, J. C.**

On the stereochemistry of the bistetrahydrofuranyl moiety of uvaricin: Proton chemical shifts can play a crucial role in complex structure determination, *Journal of the American Chemical Society*, **109**, 4402-4403. (1987)

**Hoye, T. R., Zhuang, Z. P.**

Validation of the <sup>1</sup>H NMR chemical shift method for determination of stereochemistry in the bis(tetrahydrofuranyl) moiety of uvaricin-related acetogenins from annonaceae: Rolliniastatin 1 (and asimicin), *Journal of Organic Chemistry*, **53**, 5578-5580. (1988)

**Hui, Y.-H., Rupprecht, J.K., Anderson, J.E., Liu, Y.M., Smith, D.L., Chang, C.-J., McLaughlin, J.L.**

Bullatalicin, a novel bioactive acetogenin from *Annona bullata* (Annonaceae). *Tetrahedron*. **45**, 6941-6948. (1989).

**Jacobson, M.**

Botanical pesticides: past, present and future. pp. 1-10 en: *Insecticides of plant Origin*. Arnason, J.T., Philogene, B.J., Moran, P. (eds.) A.C.S. Symposium Series 387. American Chemical Society, Washington D.C. (1989).

**James, W.C.**

Assessment of plant diseases and losses. *Annual Review of Phytopathology* **12**, 27-48. (1974).

**Jiang, Z., Yu, D.Q.**

New type of mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from *Goniothalamus donnaiensis*. *Journal of Natural Products*, **60**, 122-125. (1997)

**Jolad, S.D., Hoffmann, J.J., Schram, K.H., Cole, J.R., Tempesta, M.S., Kriek, G.R. and Bates, R.B.**

Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria acuminata* (Annonaceae). *Journal Organic Chemistry*, **47**, 3151-3153. (1982)

**Khalequzzaman, M., Sultana, S.**

Insecticidal Activity of *Annona squamosa* l. Seed Extracts against the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. bio-sci.***14**, 107-112. (2006)

**Kolukisaoglu, Ü. and K. Thurow.**

Future and frontiers of automated screening in plant sciences. *Plant Science* **178**, 476-484. (2010).

**Kumar, H., Mihn, J.A.**

Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Sugarcane Borer (Lepidoptera: Pyralidae) Damage and Grain Yield of Four Maize Hybrids in Relation to Four Tillage Systems. *Crop protection*. **21**, 121-128. (2002).

**Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R.**

The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**, 2783-2813. (1982)

**Lewis, M. A., Arnason, J. T., Philogene, B. J. R., Rupprecht, J. K. and McLaughlin, J.L.**

Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **45**, 15-23. (1993).

**Liaw, C. C., Chang, F. R., Wu, C. C., Chen, S. L., Bastow, K. F., Hayashi, K. I., Nozaki, H., Lee, K. H., Wu, Y. C.**

Nine new cytotoxic monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins from *Annona montana*. *Planta Medica*, **70**, 948-959. (2004).

**Liaw, C. C., Chang, F. R., Wu, M. J., Wu, Y. C.**

A novel constituent from *Rollinia mucosa*, rollicosin, and a new approach to develop annonaceous acetogenins as potential antitumor agents. *Journal of Natural Products*, **66**, 279-281. (2003)

**Lieb, F., Nonfon, M., Wachendorff-Neumann, U.**

Annonacins and annonastatin from *Annona squamosa*. [ANNONACINE UND ANNONASTATIN AUS ANNONA SQUAMOSA] *Planta Medica*. **56**, 317-319. (1990).

**Londershausen, M., Leicht, W., Lieb, F., Moeschler, H. and Weiss, H.**

Molecular mode of action of annonins. *Pesticide science*, **33**, 427-438. (1991).

**Maintz, J.B. and M.A. Viergever.**

A survey of medical image registration. *Medical Image Analysis* **2**, 1-36. (1998).

**Marengo, R.J., Foster, R.E., Sanchez, C.A.**

Sweet Corn Response to Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Damage during Vegetative Growth. *Journal of Economic Entomology*, **85**, 1285-1292. (1992)

**Martinez-Crovetto, R.**

Plantas utilizadas en Medicina popular en el noroeste de Corrientes (República Argentina). *Micellanea, Instituto Miguel Lillo*. **69**: 48. (1981)

**Meyer, G.E. and D. Davison.**

An electronic image plant growth measurement system. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE)* **30**, 242-248. (1987).

**Miyoshi, H.**

Structure-activity relationships of some complex I inhibitors Source of the Document. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1364**, 236-244. (1998).

**Molina-Ochoa, J., Carpenter, J.E., Heinrichs, E.A., Foster, J.E.**

Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the American and Caribbean Basin: an inventory. *Florida Entomol.* **86**, 254.(2003).

**Morré, D. J., de Cabo, R., Farley, C., Oberlies, N. H. and McLaughlin, J.L.**

Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life sciences*, **56**, 343-348. (1995).

**Murillo, A.**

Distribución, importancia y manejo del complejo *Spodoptera* en Colombia. In Memorias Seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Ed: Zuluaga, J.L., Muñoz, G. Calí, Colombia, **96**, 15-23. (1991).

**Murúa, G., Defagó, V., Virla, E.**

Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides.

*Boletín de sanidad vegetal. Plagas.* **29**, 43-51. (2003).

**Murúa, M.G., Virla, E.**

Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucuman (Argentina). *Acta Zoológica Mexicana.* **1**, 199-210. (2004).

**Murray, K.D., Hasegawa, S., Alford, A.R.**

Antifeedant activity of citrus limonoids against Colorado potato beetle: comparison of aglycones and glucosides. *Entomol. Exp. Appl.* **92**, 331-334. (1999).

**Myint, S. H., Cortes, D., Laurens, A., Hocquemiller, R., Leboeuf, M., Cavé, A., Cotte, J. and Quéro, A. M.**

Solamin, a cytotoxic mono-tetrahydrofuranic  $\gamma$ -lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry*, **30**, 3335-3338. (1991).

**Notz, A., Clavijo, S.**

Observación del daño causado por *Spodoptera frugiperda* actuando como “cortador”. *Boletín de entomología Venezolana*, **1**, 129-130. (1981).



**Oberlies, N.H., Chang, C., Mc Laughlin, J.L.** Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**, 2102-2106. (1997)

**Oberlies, N.H., Jones, J.L., Corbett, T.H., Fotopoulos, S.S., Mc Laughlin, J.L.** Tumor cell growth inhibition by several annonaceous acetogenins in vitro disk diffusion assay. *Cancer Letters*, **96**, 55-62. (1995)

**Ocampo, D.M., Ocampo, R.**

Bioactividad de la familia annonaceae. *Revista Universidad de Caldas*, **26**, 135-155. (2006).

**Pagola, M., R. Ortiz, I. Irigoyen, H. Bustince, E. Barrenechea, P. Aparicio-Tejo, C. Lamsfus, and B. Lasa.**

New method to assess barley nitrogen nutrition status based on image colour analysis: Comparison with SPAD-502. *Computers and Electronics in Agriculture* **65**, 213-218. (2009).

**Pannell, L.K., Pu, Q.L., Fales, H.M., Mason, R.T., Stephenson, J.L.**

Intermolecular processes in the ion trap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, **61**, 2500-2503. (1989)

**Parodi, L.**

Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Ed. ACME, S.A.C.I., Buenos Aires, vol. II, cap. XXIII. (1964)

**Parvin, S., Islam, E., Rahman, M. y Haque, E.**

Pesticidal activity of Pure Compound Annotemoyin-1 Isolated from chloroform extract of the plant *Annona squamosa* Linn. against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pak. Journal of Biological Sciences*. **6**, 1088-1091. (2003).

**Pastrana, J.A., Hernandez, J.O.**

Clave de orugas de lepidópteros que atacan al maíz en cultivo. *RIA. Serie 5. Patología Vegetal*. v. XIV, n. 1 1978/79, 26-45. (1979).

**Pettit, G.R., Riesen, R., Leet, J. E., Polonsky, J., Smith, C.R., Schmidt, J.M., Dufresne, C., Schaufelberger, D., Moretti, C.**

Isolation and structure of rolliniastatin-2: A new cell growth inhibitory acetogenin from *Rollinia mucosa*. *Heterocycles*. **28**, 213-217. (1989)

**Peyrat, J. F., Mahuteau, J., Figadère, B. and Cavé, A.**

NMR studies of Ca<sup>2+</sup> complexes of Annonaceous acetogenins. *Journal of Organic Chemistry*, **62**, 4811-4815. (1997).

**Rasband, W.S.**

ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,  
<http://rsbweb.nih.gov/ij/> (2007).

**Restrepo, J. y Vinasco, L.E.**

Evaluación fisicoquímica de la fracción lipídica de las semillas de guanábana (*Annona muricata*) y la chirimoya (*Annona cherimolia*). *Revista de Ciencias de la Universidad del Valle*, **14**, 117-124 (2010).

**Rieser, M. J., Gu, Z. M., Fang, X. P., Zeng, L., Wood, K. V., McLaughlin, J. L.**

Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*. **59**, 100 - 108. (1996).

**Ríos-Díez J. D., Saldamando-Benjumea C. I.**

Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Two Insecticides, Methomyl and Lambda-Cyhalothrin: A Study of the Genetic Basis of Resistance. *Journal of Economic Entomology*. **104**, 1698-1705. (2011).

**Rincón Guerrero, N.; Olarte Quintero, M. A. y Pérez Naranjo, J. C.**

Leaf Area Measurement in Photographs Taken with a Webcam, a Cell Phone or a Semi Professional camera. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* **65**: 6399-6405. (2012).

**Ruiz Hidalgo, J., Parellada, E. A., Di Toto Blessing, L., Bardón, A., Ameta, K. L., Vera, N., Neske, A.**

Natural and Derivatized Acetogenins Promising for the Control of *Spodoptera frugiperda* Smith, Journal of Agricultural Chemistry and Environment. **5**, 200-210. (2016).

**Rupprecht, J.K., Hui, Y.H., Mc Laughlin, J.L.**

Annonaceous acetogenins: a review. Journal of Natural Products, **53**, 237-278. (1990).

**Sasaki, S., Maruta, K., Naito, H., Sugihara, H., Hiratini, K. and Maeda, M.**

New calcium-selective electrodes based on Annonaceous acetogenins and their analogs with neighboring bistetrahydrofuran. *Tetrahedron Letters*, **36**, 5571-5574. (1995).

**Schlechtendal, D.F.L. Von, De.**

Linnea. **9**: 315-331. (1935).

**Shimada, H., Grutzner, J. B., Kozlowski, J. F. and McLaughlin, J.L.** Membrane

conformations and their relation to cytotoxicity of asimicin and its analogues.

*Biochemistry*, **37**, 854-866. (1998).

**Sosa, M.A.**

Estimación de daño de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lep.: Noctuidae) en maíz con infestación natural en tres fechas de siembra en el noroeste santafesino. INTA. Centro Regional Santa Fe, Estación Experimental Agropecuaria Reconquista, Información para extensión. **70**, 39.(2002a).

**Sosa, M.A.**

Fluctuación de la población de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lep.: Noctuidae) en el noroeste santafesino según capturas en trampas de luz. INTA. Centro Regional Santa Fe, Estación Experimental Agropecuaria Reconquista, Información para extensión. **70**, 46.(2002b).

**Sosa, M.A.**

Daño producido por *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) sobre el rendimiento del cultivo de maíz en siembra directa, según tiempos de exposición a la plaga. INTA, Centro Regional Santa Fe, Estación Experimental Agropecuaria Reconquista, Información para extensión. **70**, 46-52. (2002c).

**Sparks, A.N.**

A review of the biology of the fall armyworm. *Florida Entomologist*, **62**, 82-87. (1979).

**Takebe, M. and T. Yoneyama.**

Measurement of leaf color scores and its implication to nitrogen nutrition of rice plants. *Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)* **23**, 86-93. (1989).

**Takhtajan, A., Zimmermann, W.**

On the higher taxa of Embryophyta. *Taxon*. **15**, 129-134. (1966).

**Tinoco, C.**

Arreglo Espacial de Híbridos de Maíz, Índice de Área Foliar y Rendimiento. INIFAP. Veracruz México. (2008).

**Tormo, J.R., Gallardo, T., Gonzalez, M.C., Bermejo, A., Cabedo, N., Andreu, I., Estornell, E.**

Current Topics in Phytochemistry. **2**: 69. (1999).

**Turlings, T.C.J., Houghrin, L.J., McCall, P.J.**

How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**, 4169-4174. (1995).

**Valverde, M.E., Paredes-López, O., Pataky, J.K., Guevara-Lara, F.**

Huitlacoche (Ustilago maydis) as a food source--biology, composition, and production. *Critical reviews in food science and nutrition*. **35**, 191-229. (1995).

**Vásquez Chávez, R., Coimbra Sanz, G.**

Frutas silvestres comestibles de Santa Cruz, Ed: Oficialía Mayor de Cultura y Desarrollo Humano, Gobierno Municipal de Santa Cruz de la Sierra. pp. 267. (1996).

**Virla, E.G., Álvarez, A., Loto, F., Pera, L.M., Baigorí, M.**

Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. *Florida entomologist*. **91** (1): 63-69. (2008).

**Wang, L-Q., Nakamura, N., Meselhy, R., Hattori, M., Zhao, W. M., Cheng, K. F., Yang, R. Z., Qin, G.W.**

Four Mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, Montanacis B-E, from *Annona montana*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. **48**, 1109-1113. (2000).

**Wang, L-Q., Min, B.S., Li, Y., Nakamura, N., Qin, G.W., Li, C-J., Hattori, M.**

Bioorg. Med. Chem. **10**: 561-565, (2002).

**Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. and Preis, D.**

The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, **197**, 563-576. (1991).

**Whittaker, R.H., Feeny, P.P.**

Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. *Science*. **171**, 757-770. (1971).

**Willink, E., Osorio, V.M., Costilla, M.A.**

Daños, pérdidas y niveles de daño económico por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. *Rev.Ind. Agríc. Tucumán*. **70**, 49. (1993).

**Wolfgang, F.R., Medeiros, P.M., Simoneit, B.R.T.**

*Environmental Engineering Science*. **29**, 1-13. (2012).

**Wu, Y.-C., Chang, F.-R., Duh, C.-Y., Wang, S.-K.**

Annoetretin and isoannoetretin: Two new cytotoxic acetogenins from *Annona reticulata* (Article) *Heterocycles*. **34**, 667-674. (1992).

**Xu, L., Chang, C. J., Yu, J. G., Cassady, J. M.**

Chemistry and selective cytotoxicity of Annonacin-10-one, Isoannonacin, and Isoannonacin-10-one: Novel polyketides from *Annona densicoma* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, **54**, 5418-5421. (1989).

**Yang, H., Zhang, N., Li, X., Chen, J., Cai, B.**

Structure–activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 2199–2202. (2009).

**Záchia, R.A.**

Estudios taxonómicos na familia Annonaceae Juss. No Río Grande do Sul. Brasil. Porto Alegre: Universidade Federal do Río Grande do Sul, Curso de Pósgraduação em Botânica. Disertação (mestrando em Botânica). Instituto de Biociências. U.F.R.G.S. (1994).

**Zafra-Polo, M.C., Figadere, B., Gallardo,T., Tormo, J., Cortes, D.**

Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, **48**, 1087-1117. (1998).

**Zafra-Polo, M.C., González, M.C., Estornell, E., Sahpaz, S. and Cortes, D.**

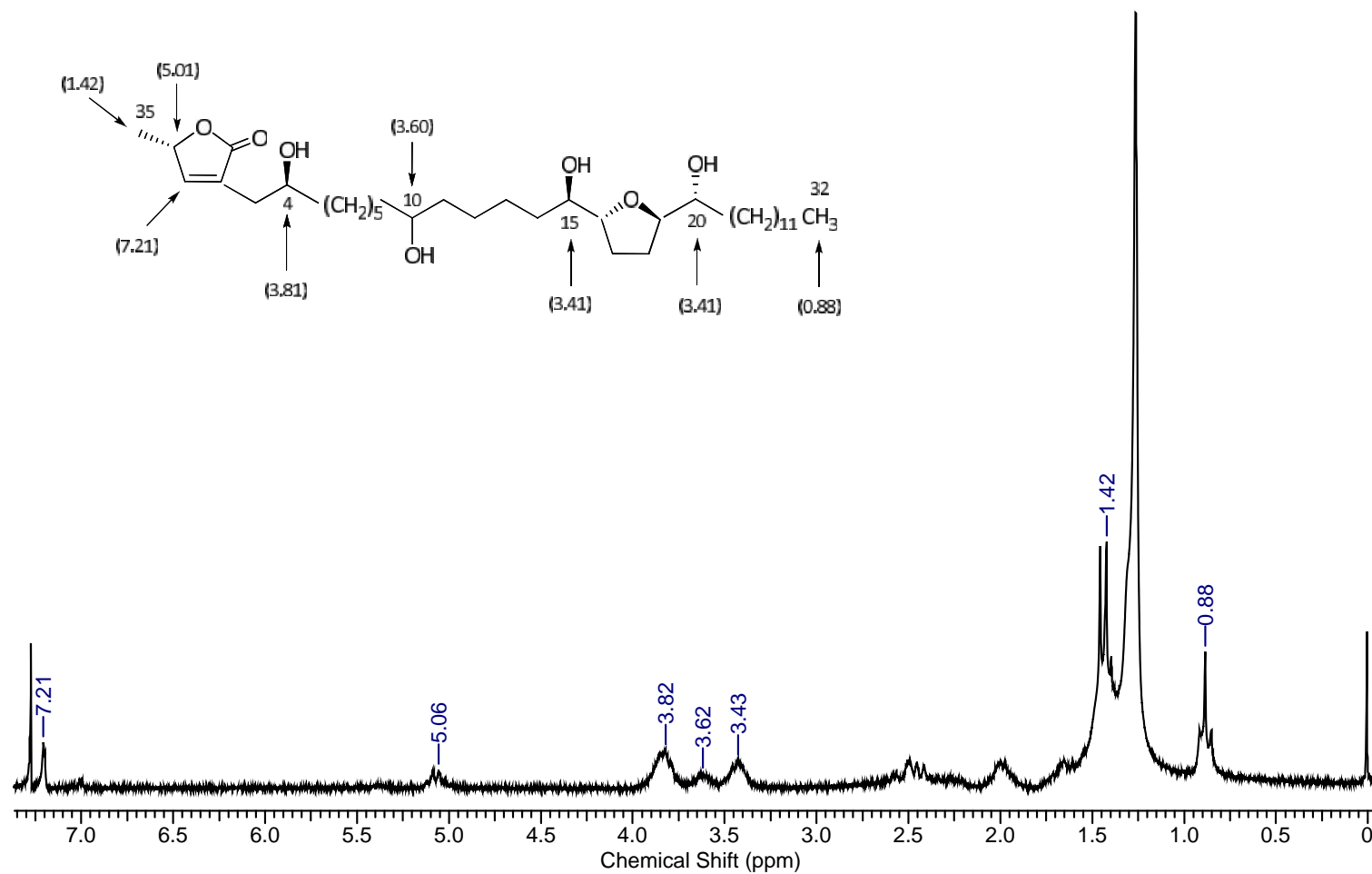
Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*, **42**, 253-271. (1996).

**Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N.H., Shi, G., Gu, Z.M., He, K. and Mc Laughlin, J.L.**

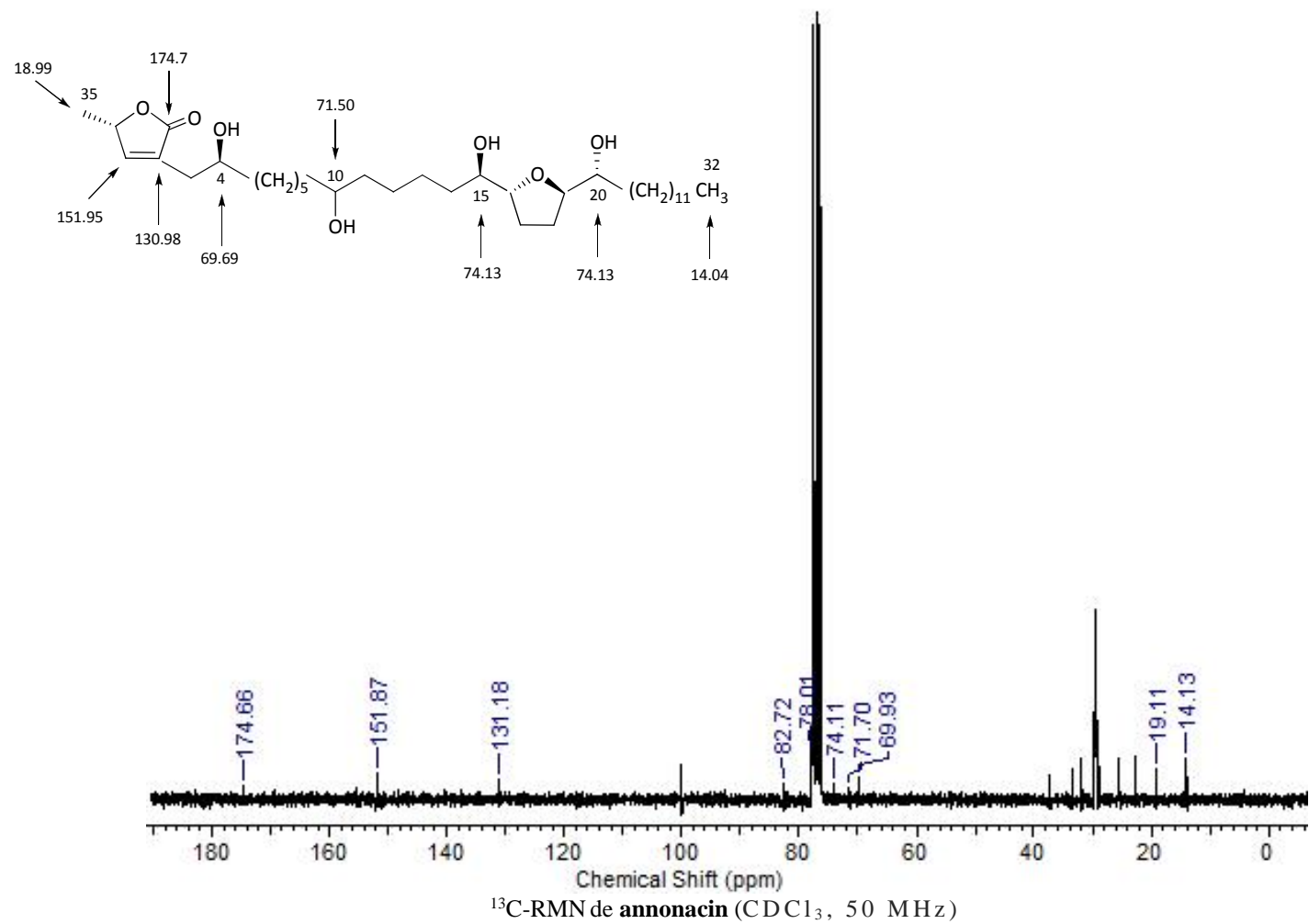
Recent advances in annonaceous acetogenins. *Natural Products Reports*, **13**, 275-306. (1996).

**Zhao, G. X., Miesbauer, L. R., Smith, D.L., McLaughlin, J.L.**

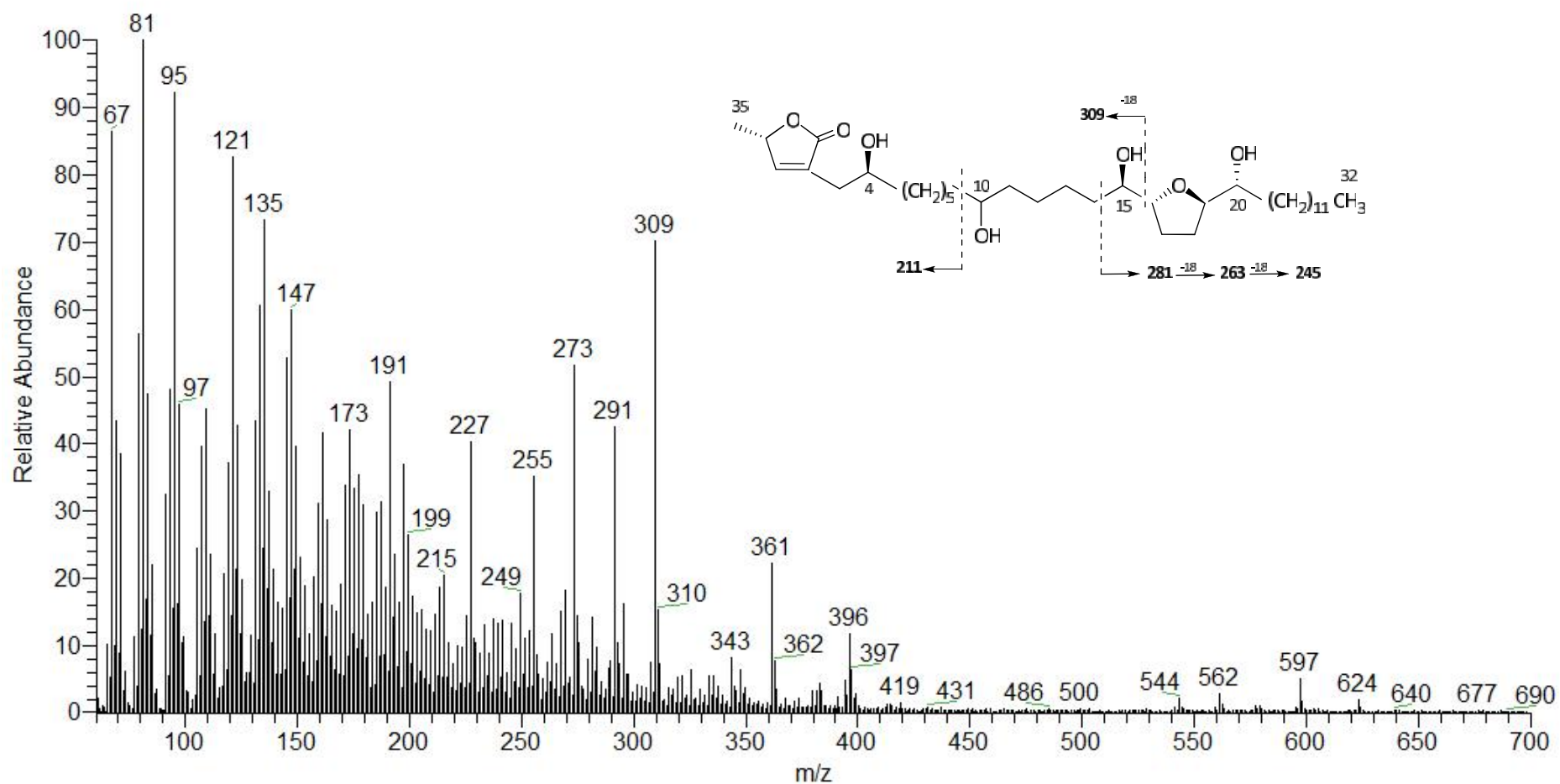
asimin, asiminacin, and asiminecin: novel highly cytotoxic asimicin isomers from *asimina triloba*. *Journal of Medicinal Chemistry*, **37**, 1971-1976. (1994).



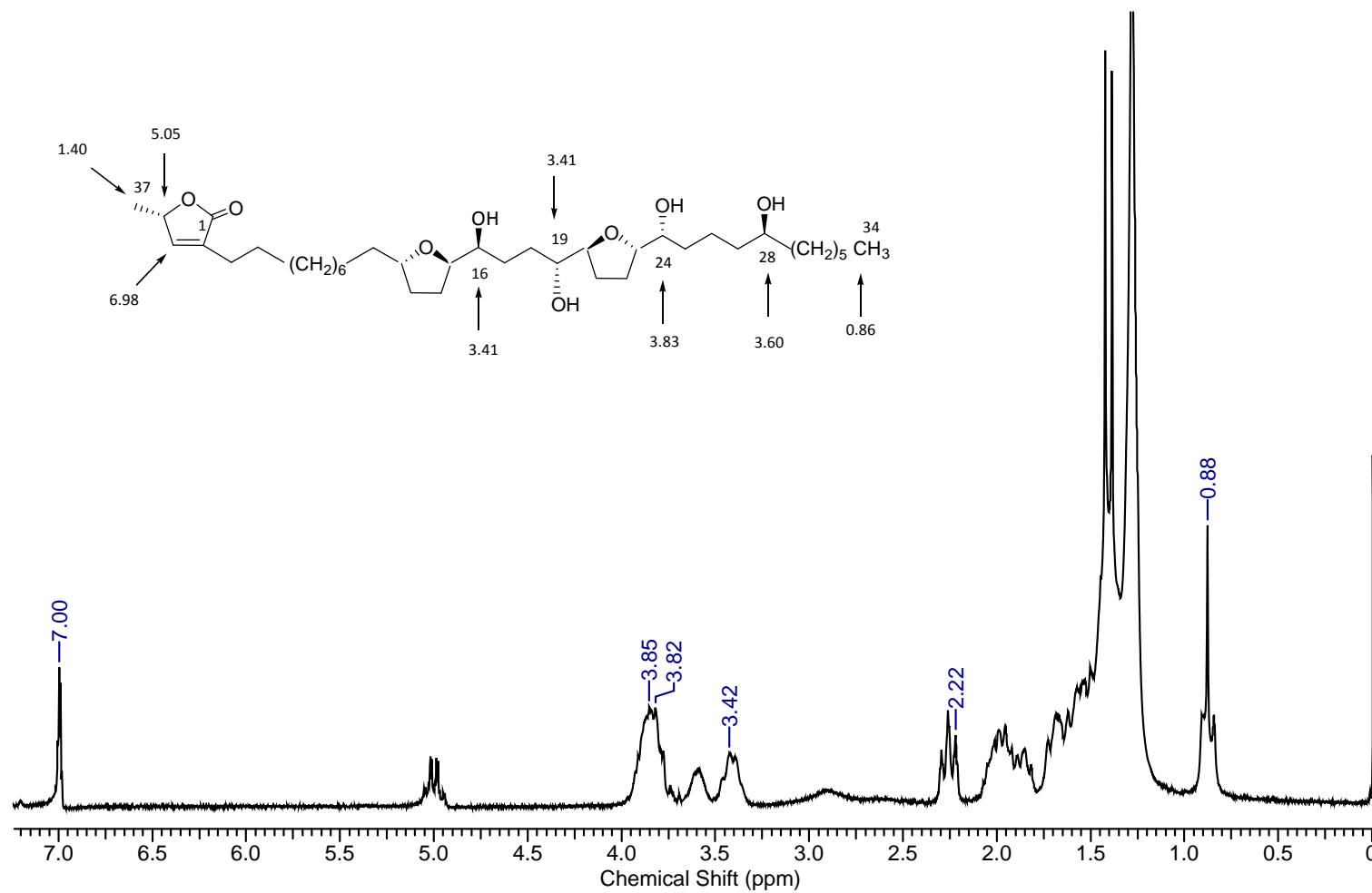
$^1\text{H}$ -RMN de **annonacin** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



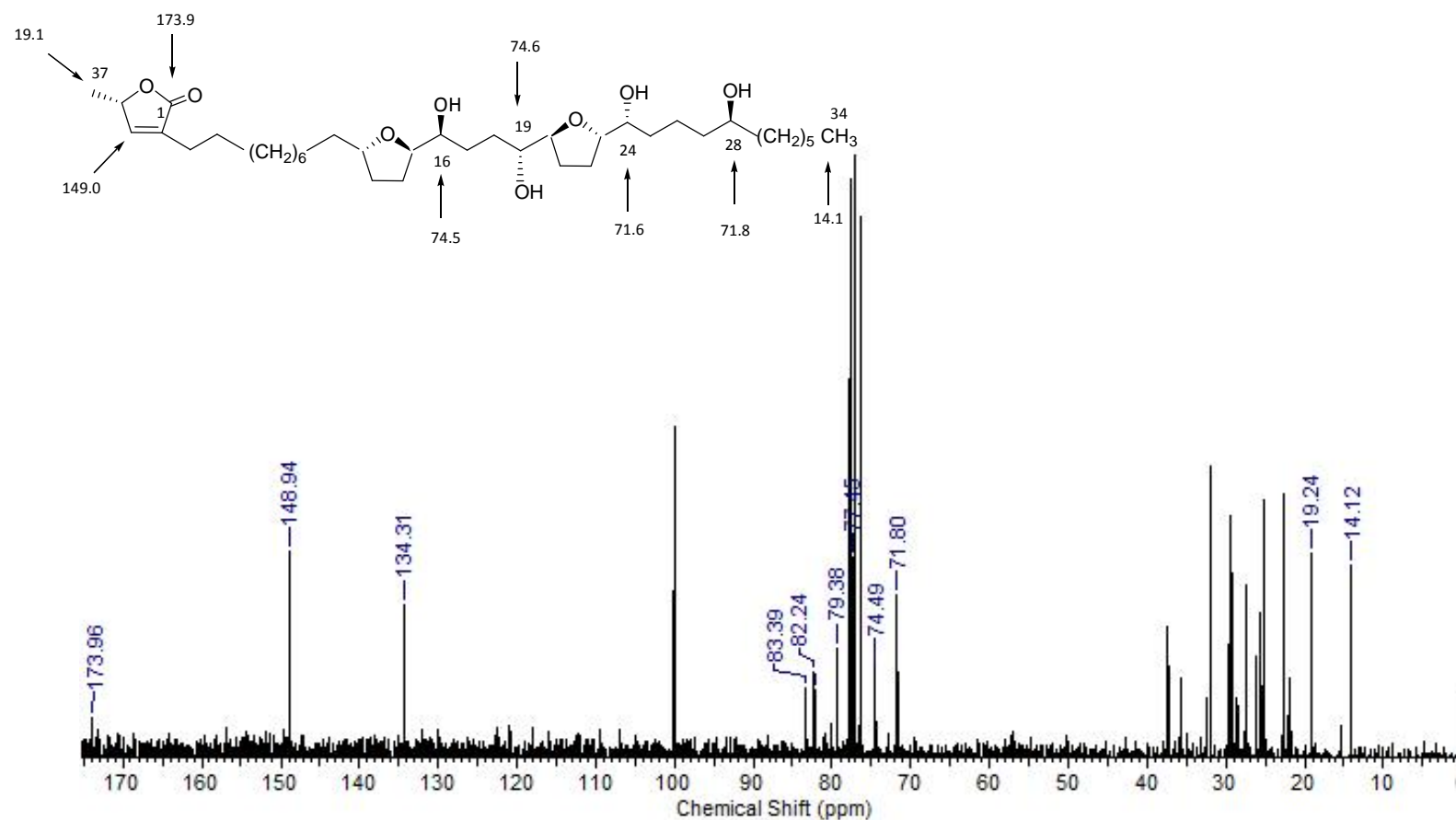




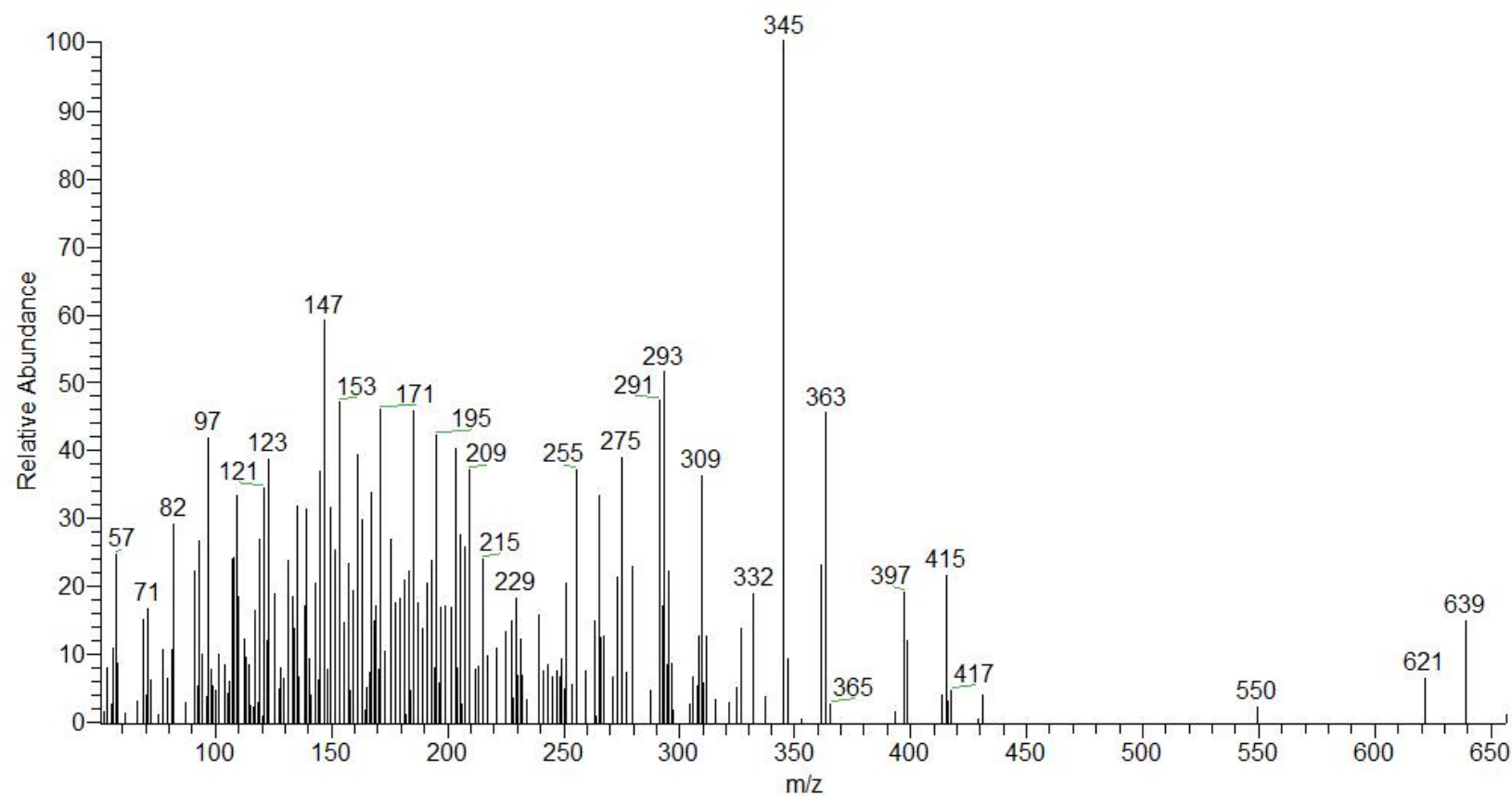
Fragmentación de **annonacin** (IE a 70 eV)



$^1\text{H}$ -RMN de almuñequin ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

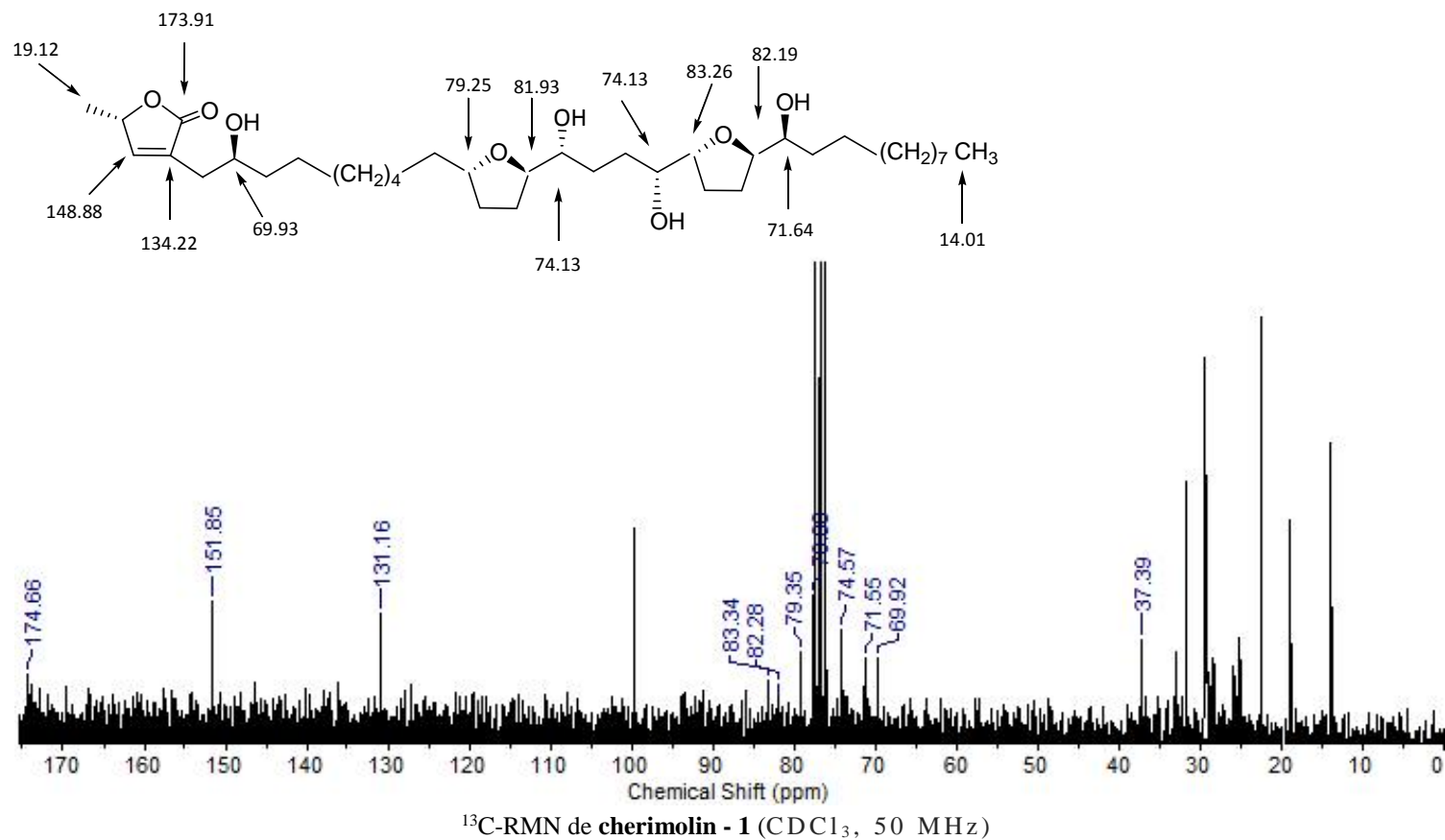


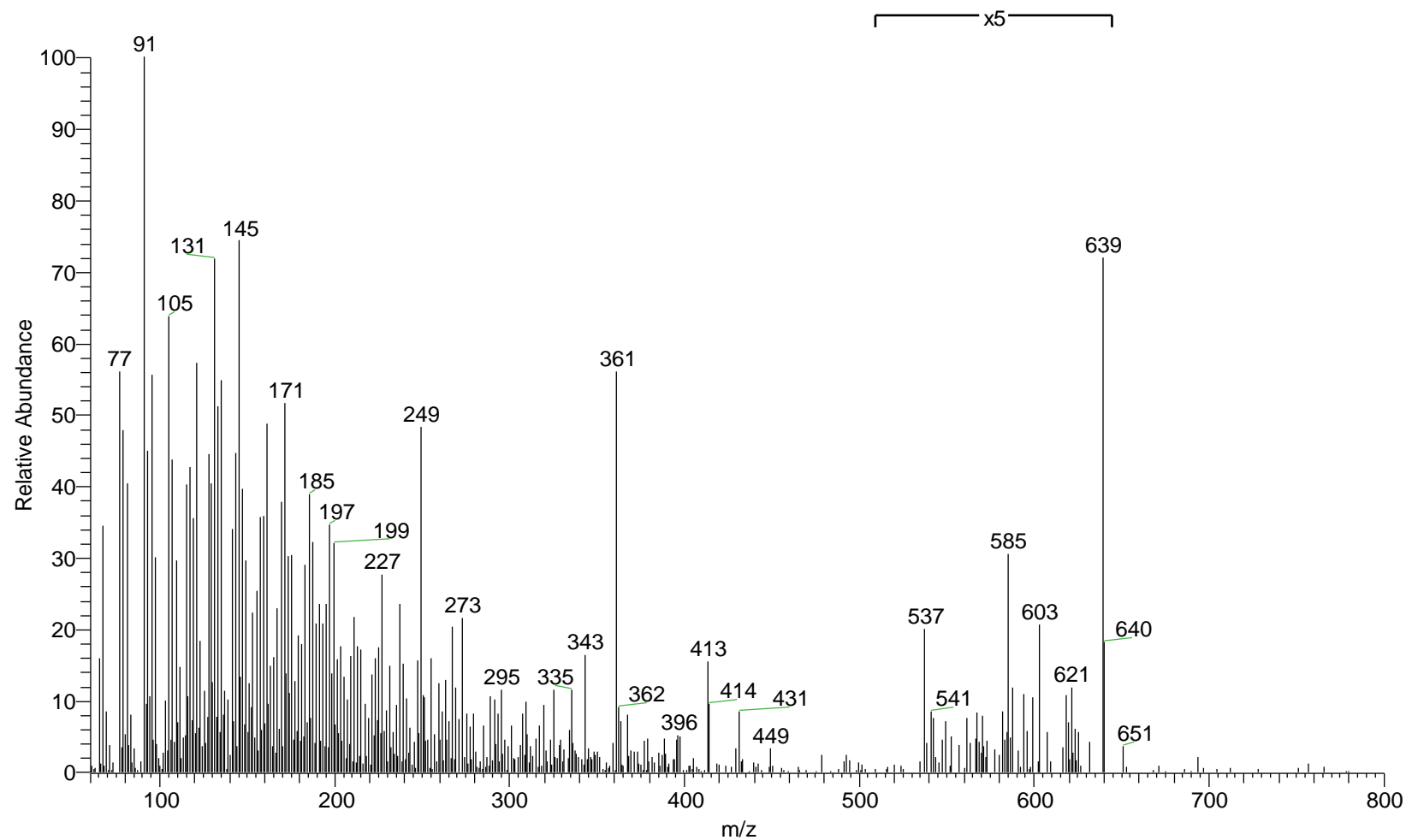
$^{13}\text{C}$ -RMN de **almuñequin** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)



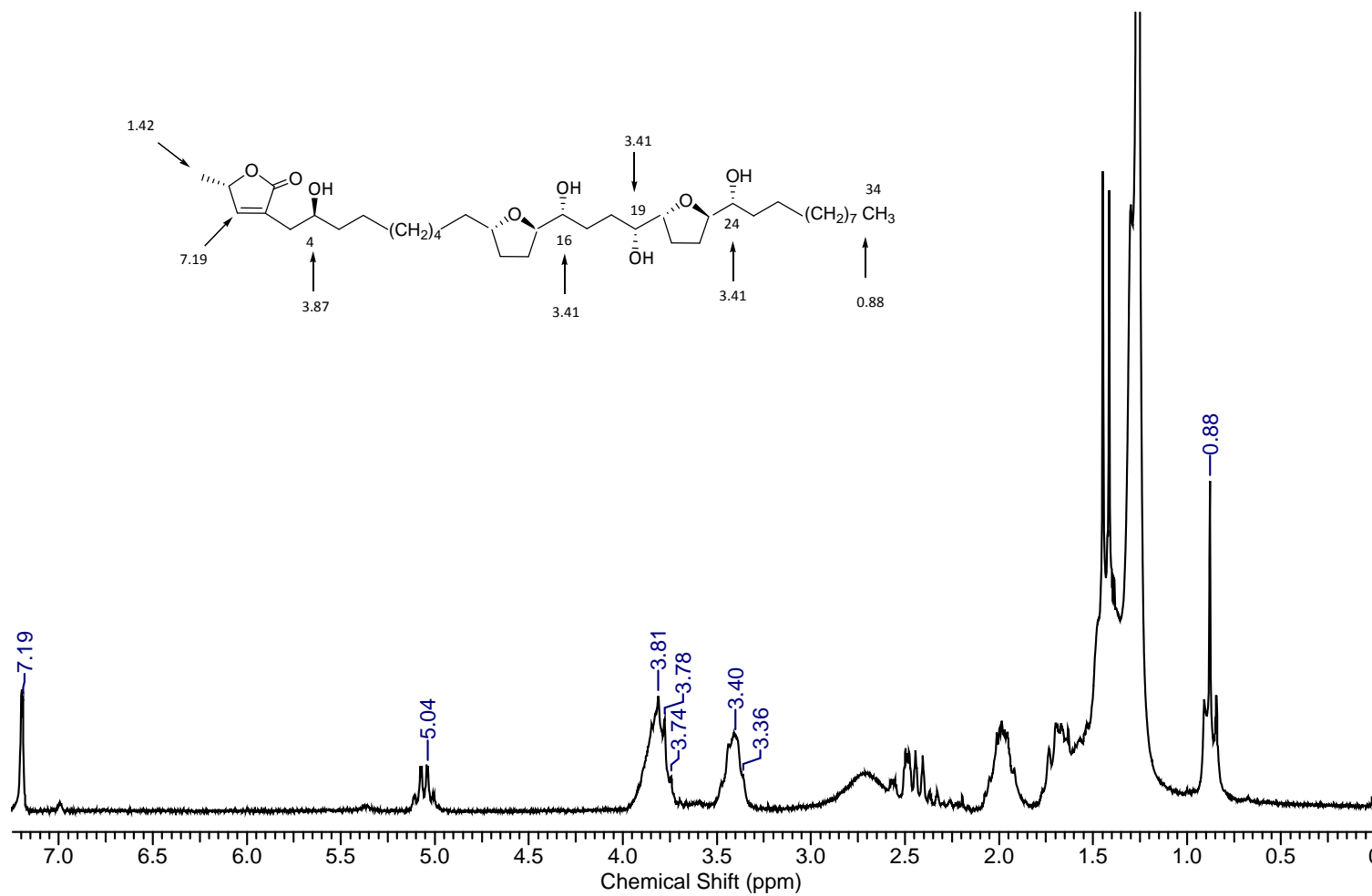
Fragmentación de **almuñequin** (IE a 70 eV)





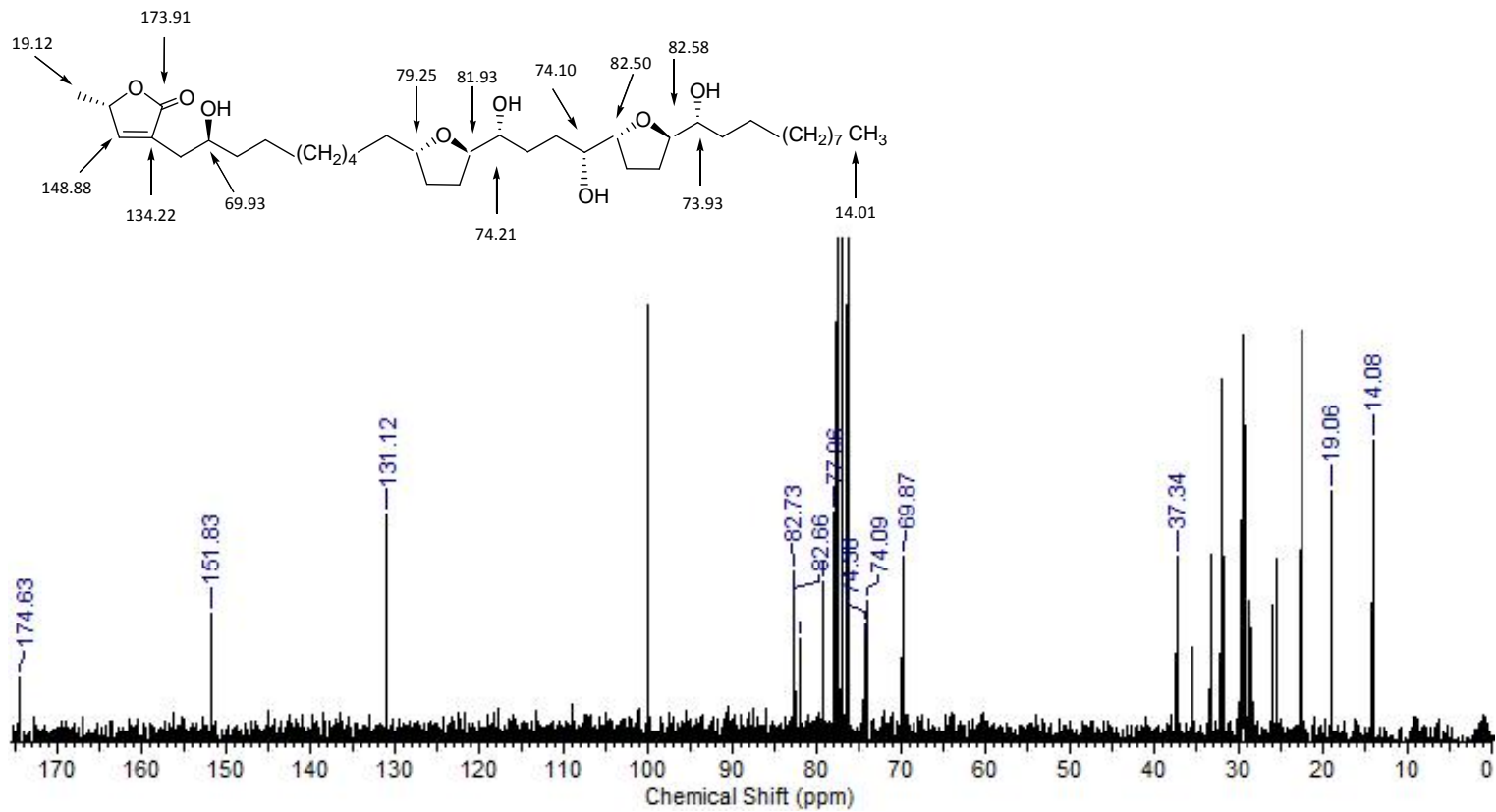


Fragmentación de **cherimolin-1** (IE a 70 eV)

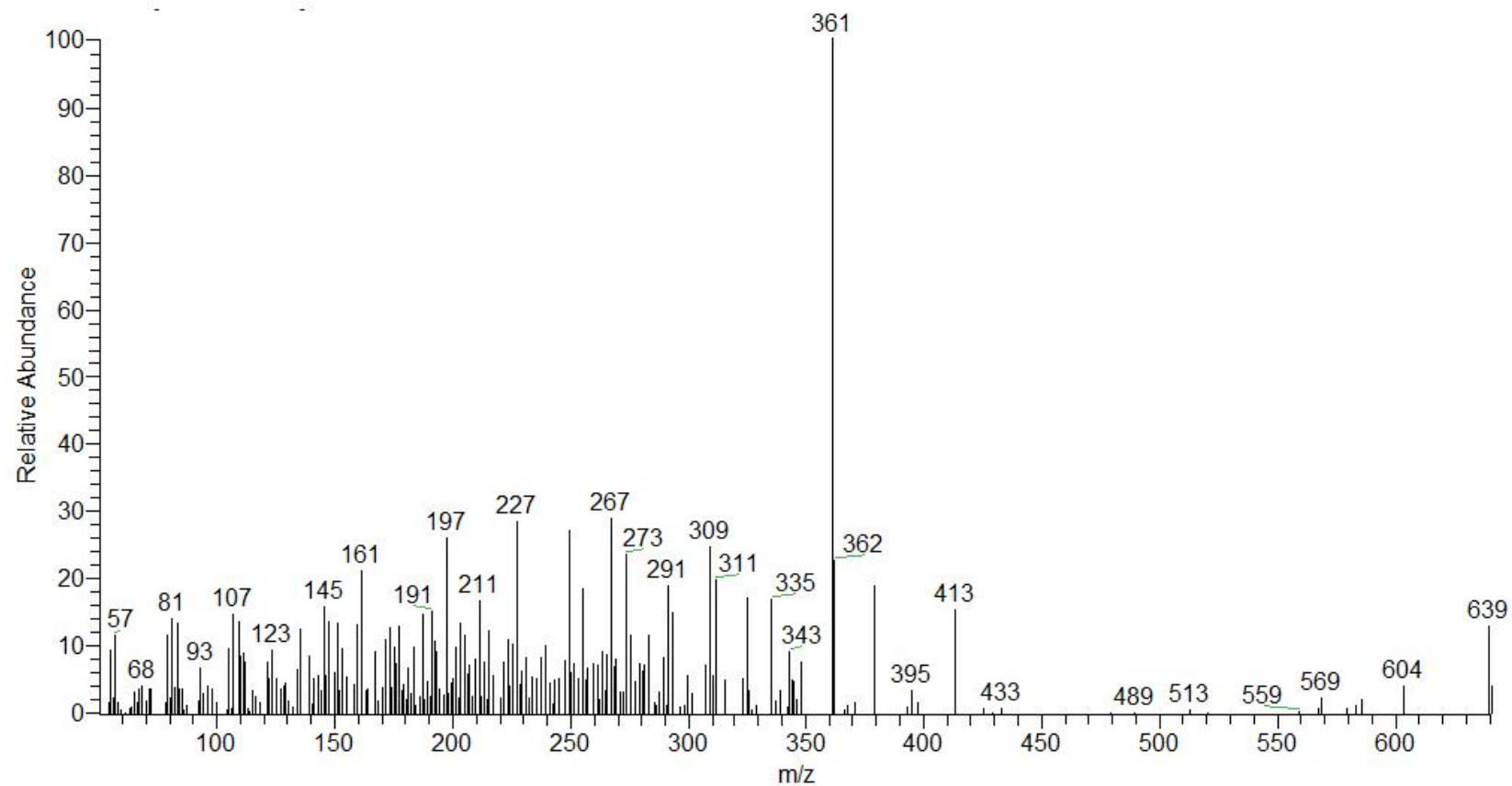


<sup>1</sup>H-RMN de **cherimolin-2** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

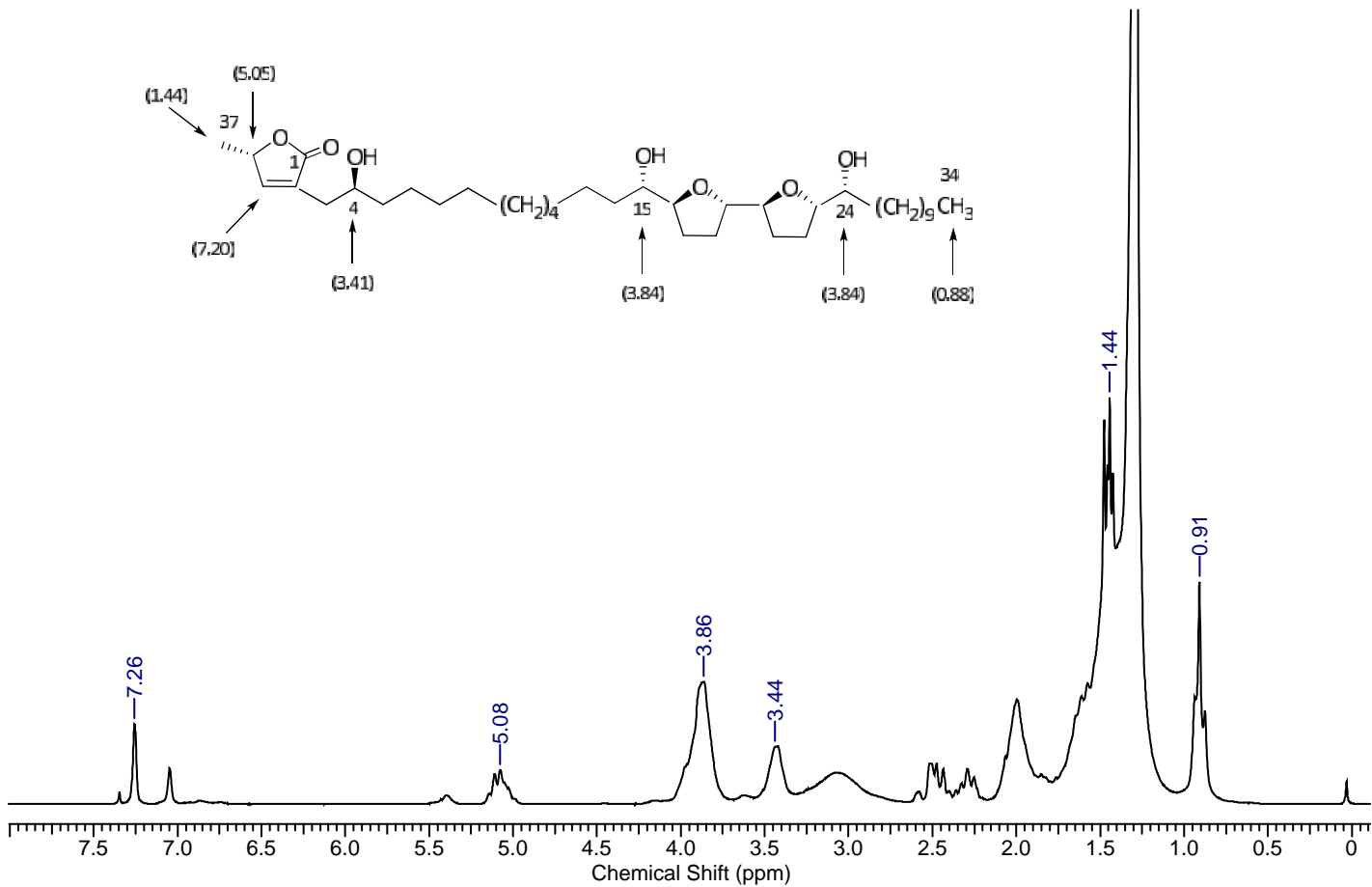




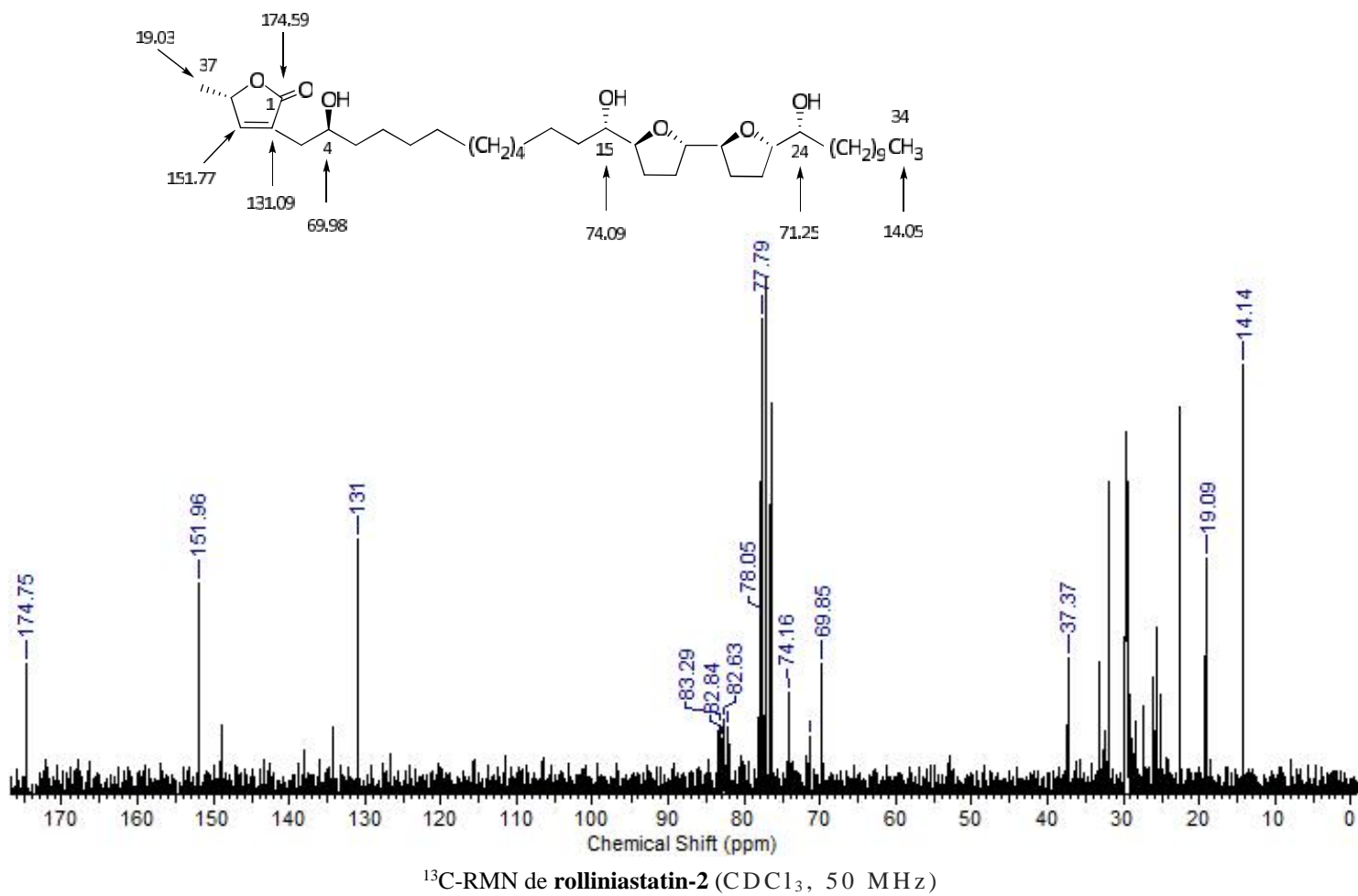
$^{13}\text{C}$ -RMN de cherimolin-2 (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

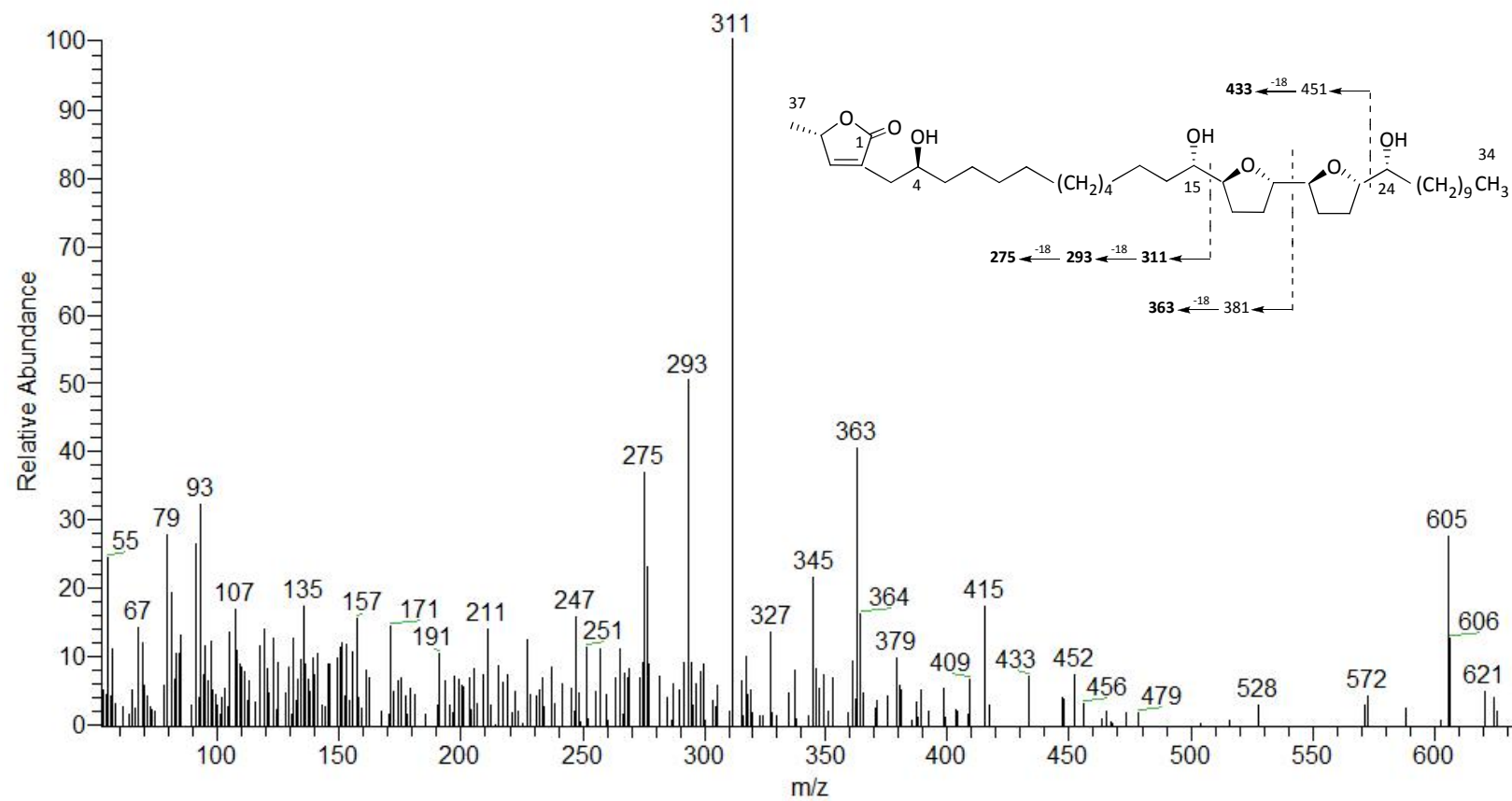


Fragmentación de **cherimolin-2** (IE a 70 eV)

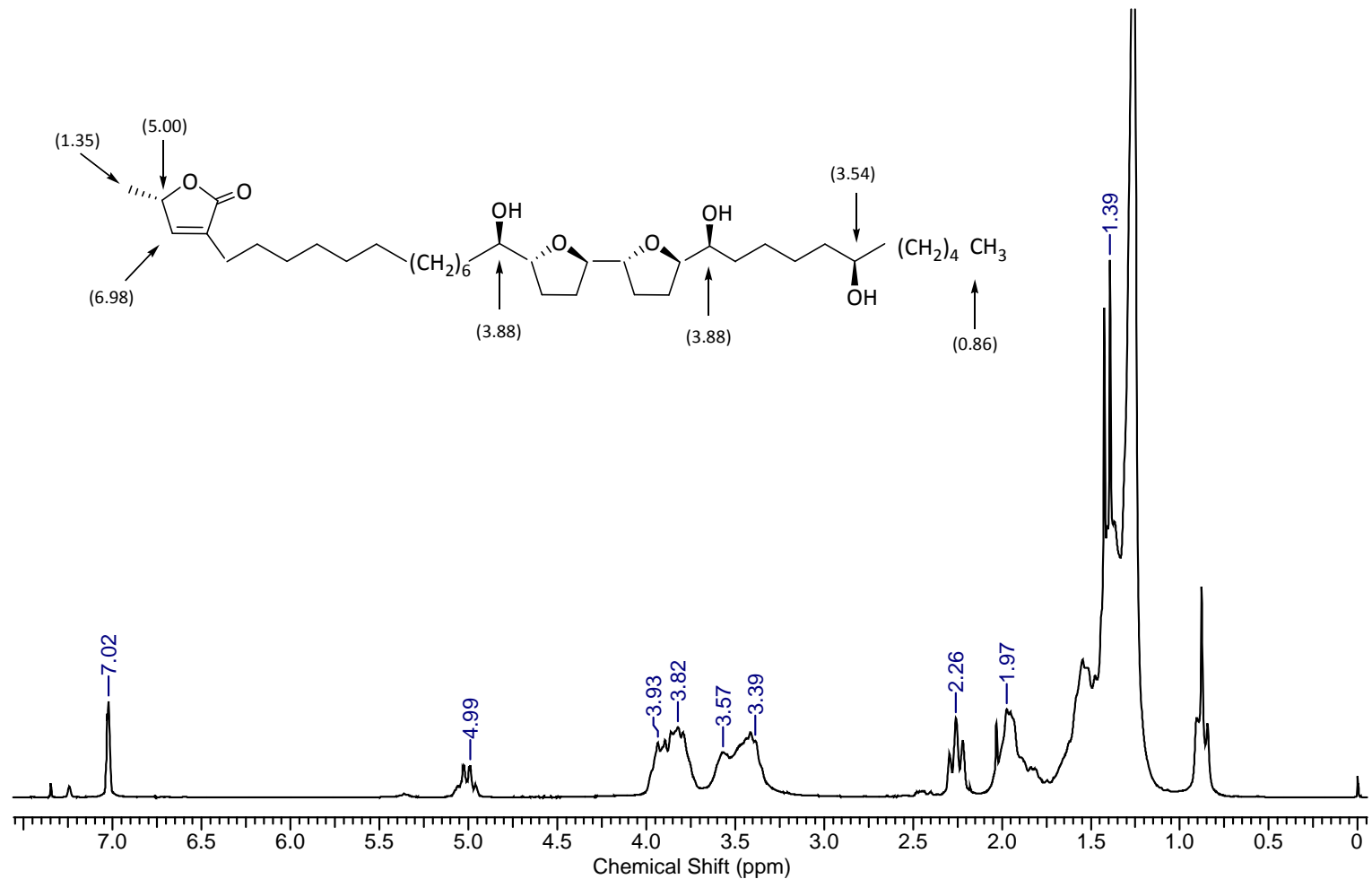


<sup>1</sup>H-RMN de **rolliniastatin-2** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

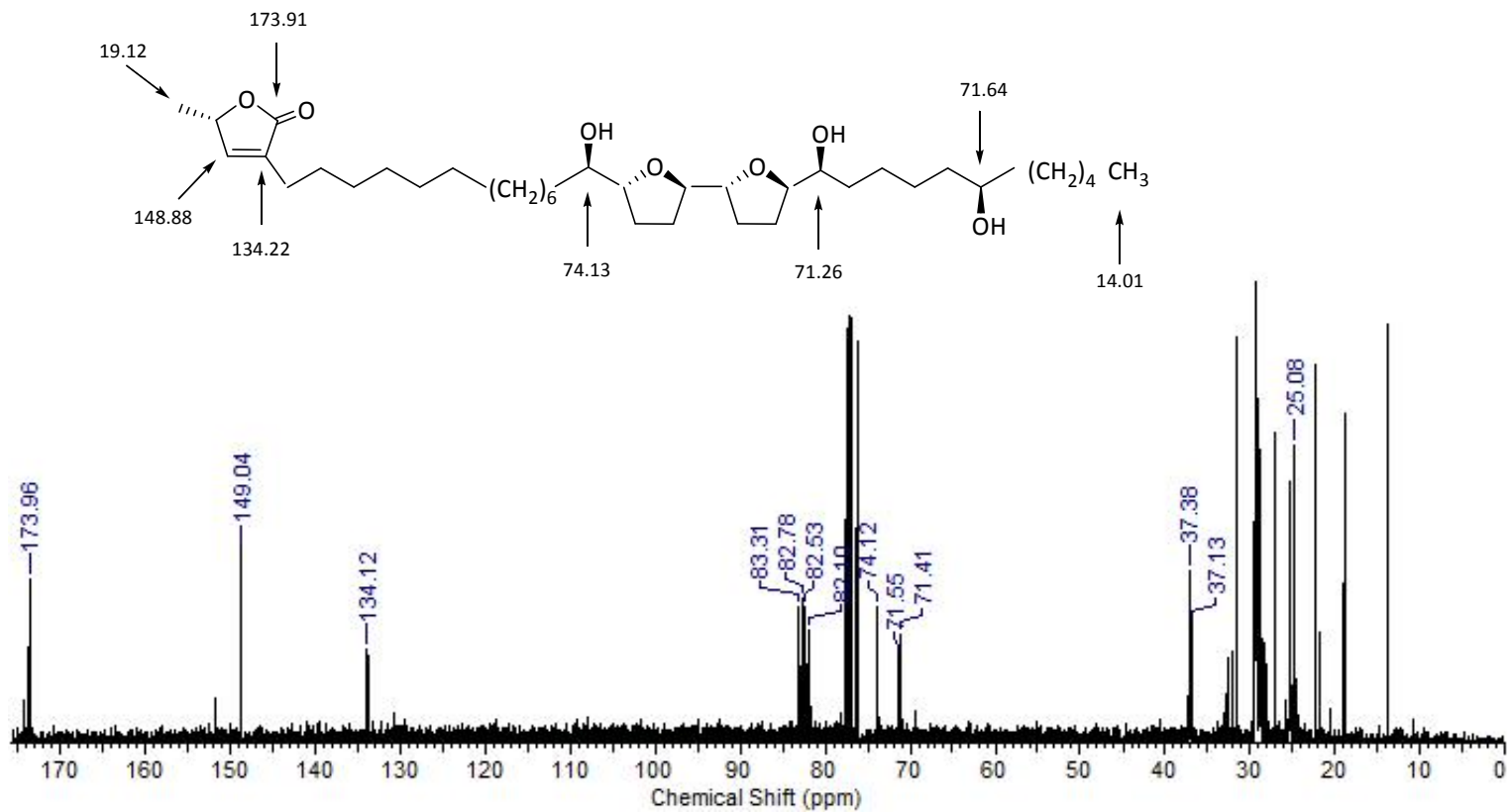




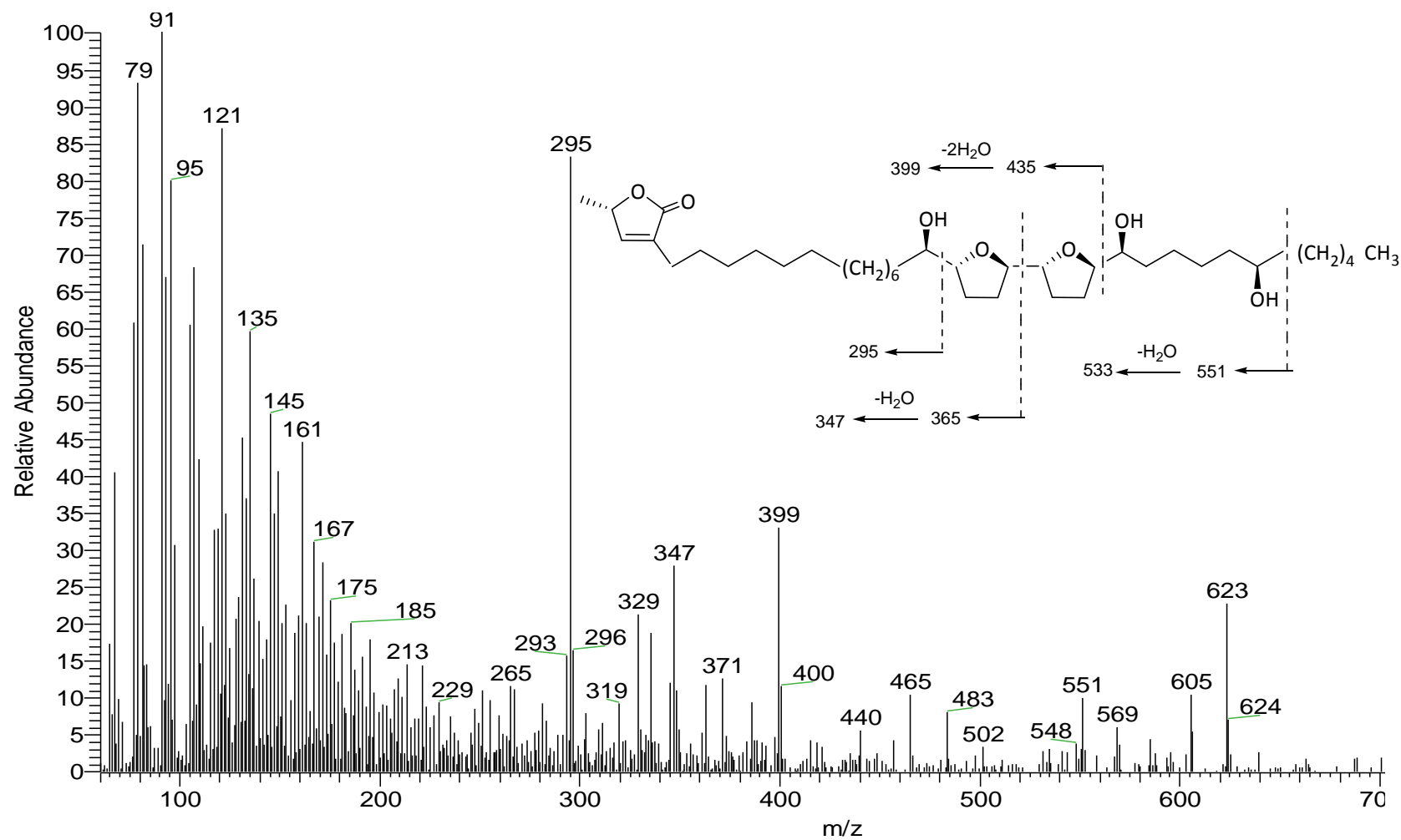
Espectro de masas de **rolliniastatin-2** (IE, 70 eV)



$^1\text{H}$ -RMN de **motrilin** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

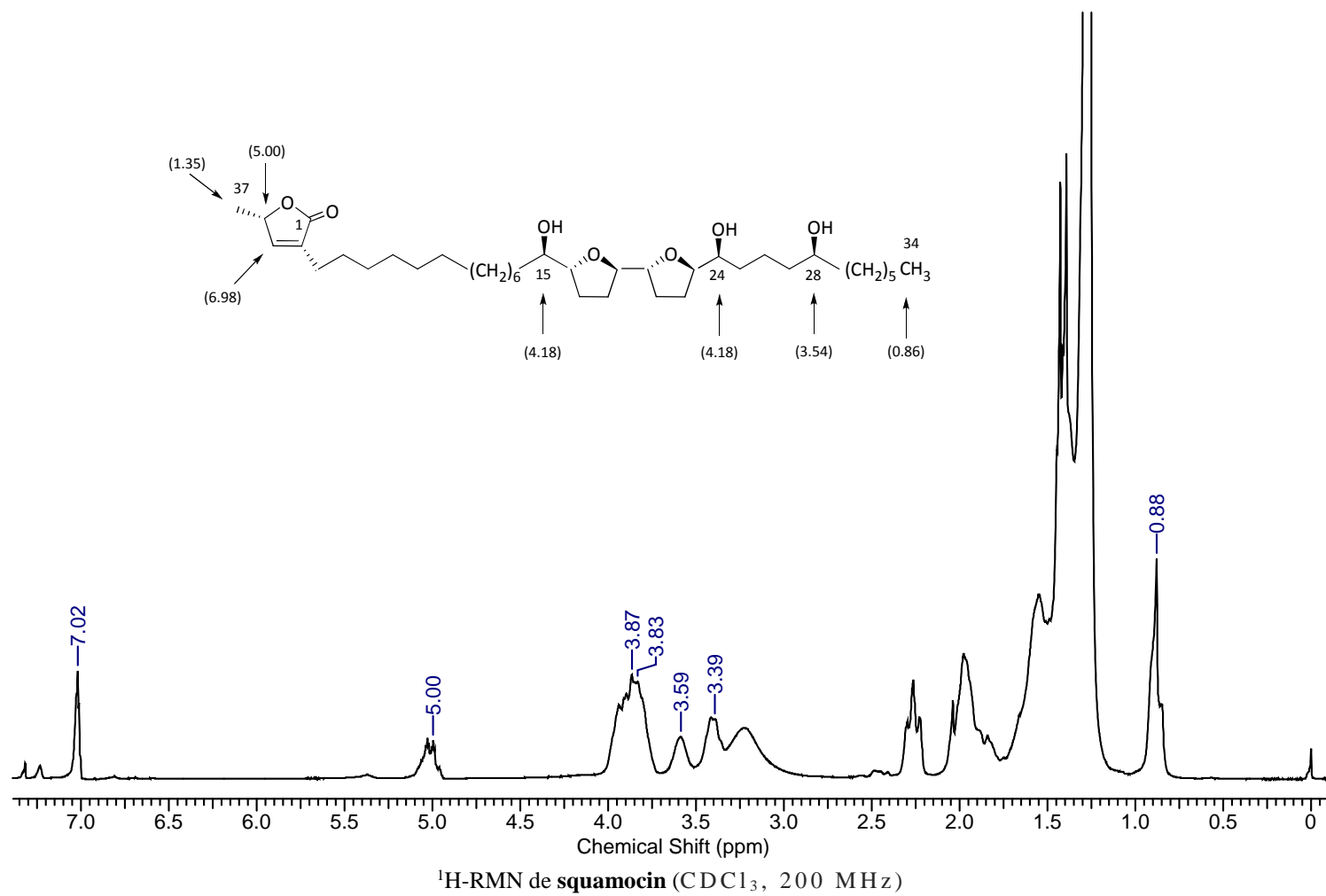


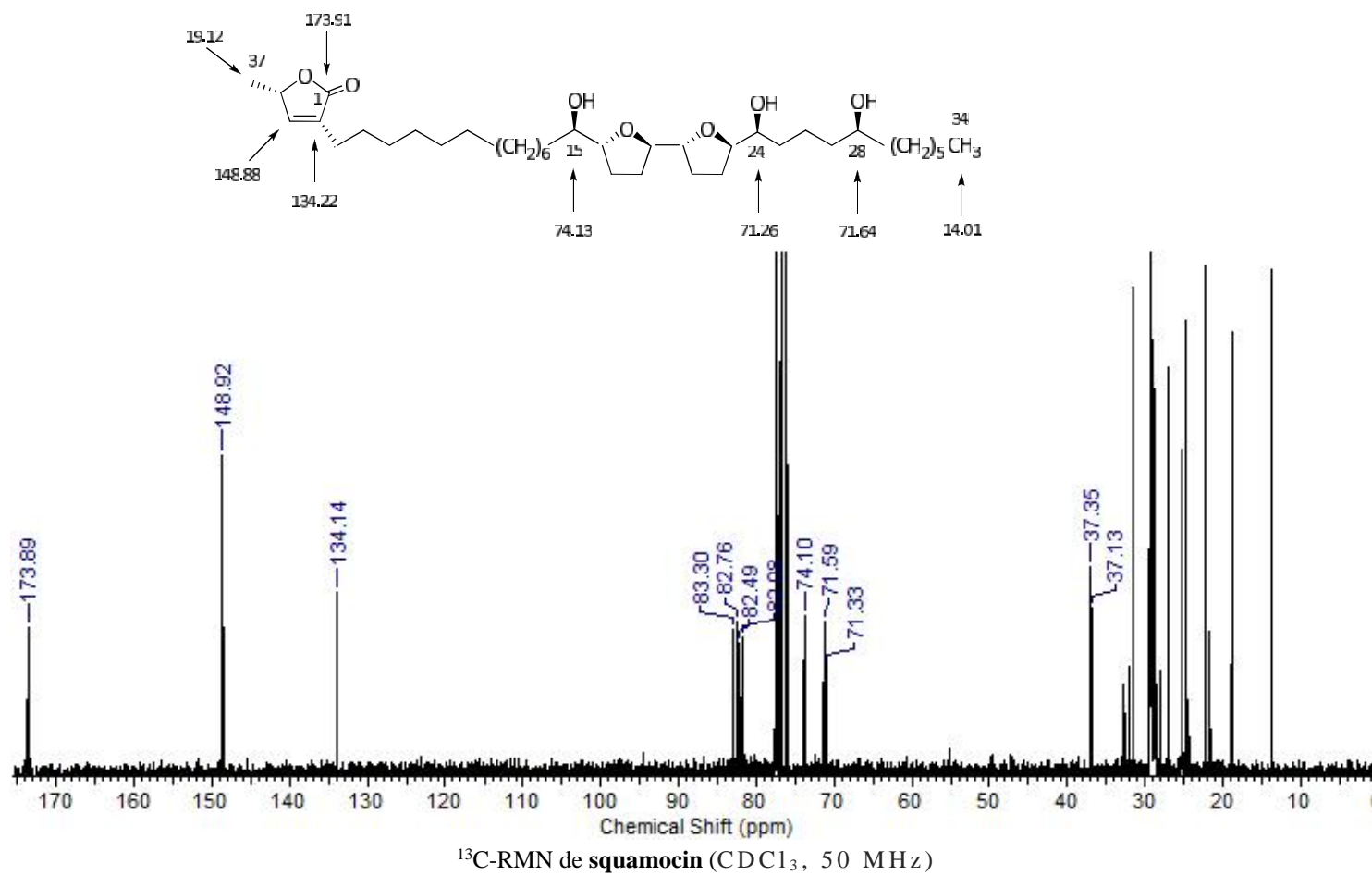
<sup>13</sup>C-RMN de **motrilin** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

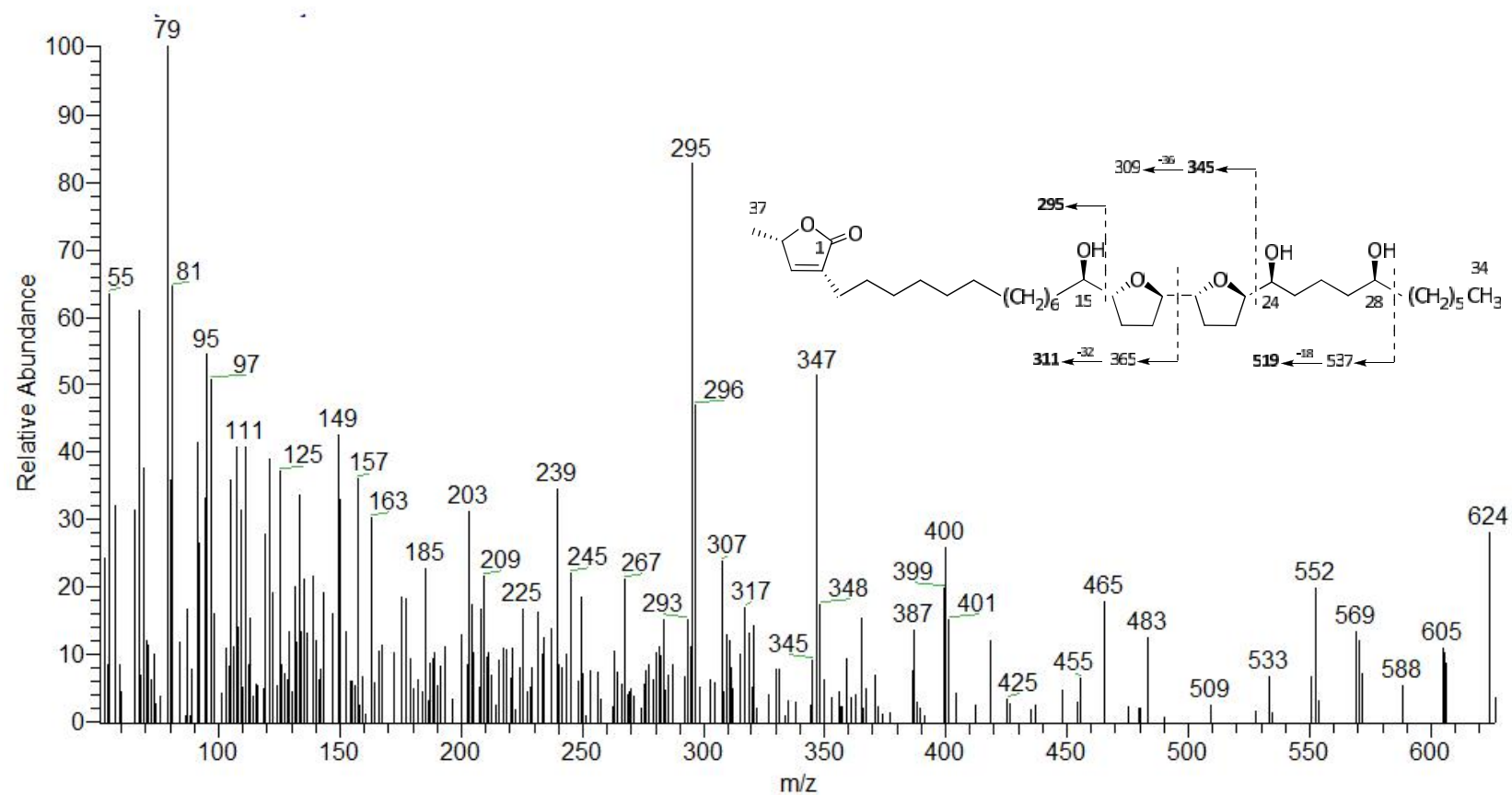


Fragmentación de **motrilin** (IE a 70 eV)

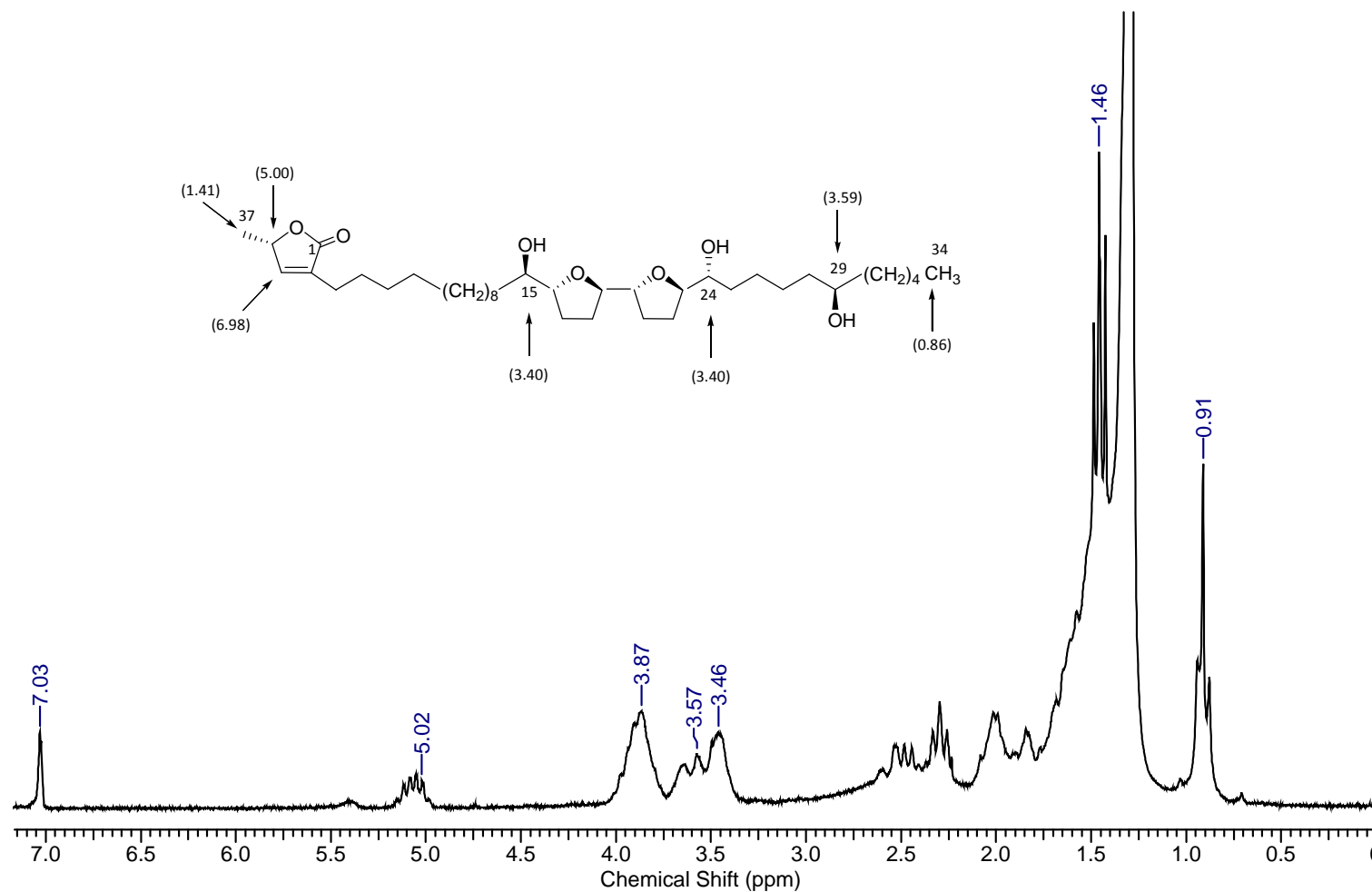




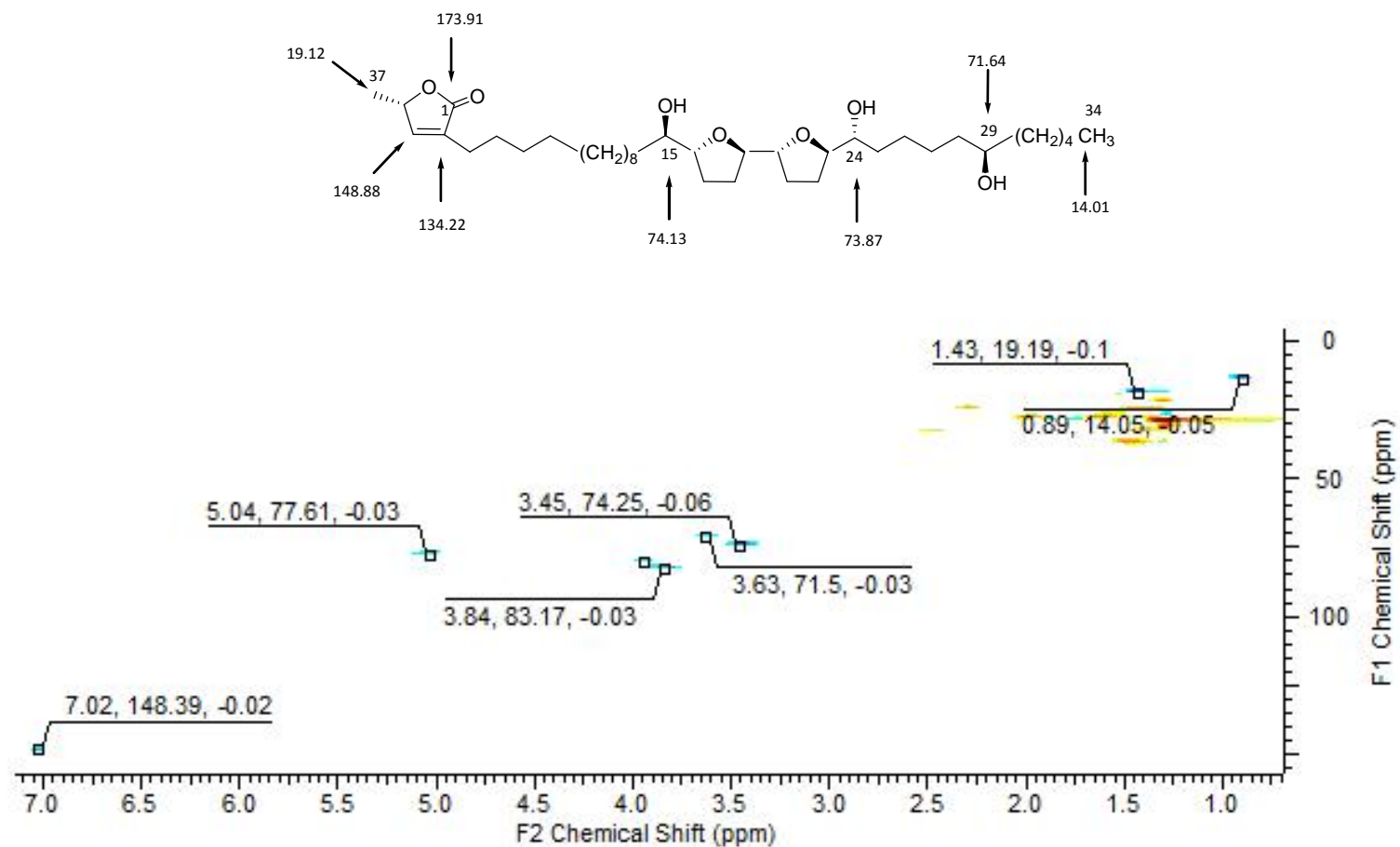




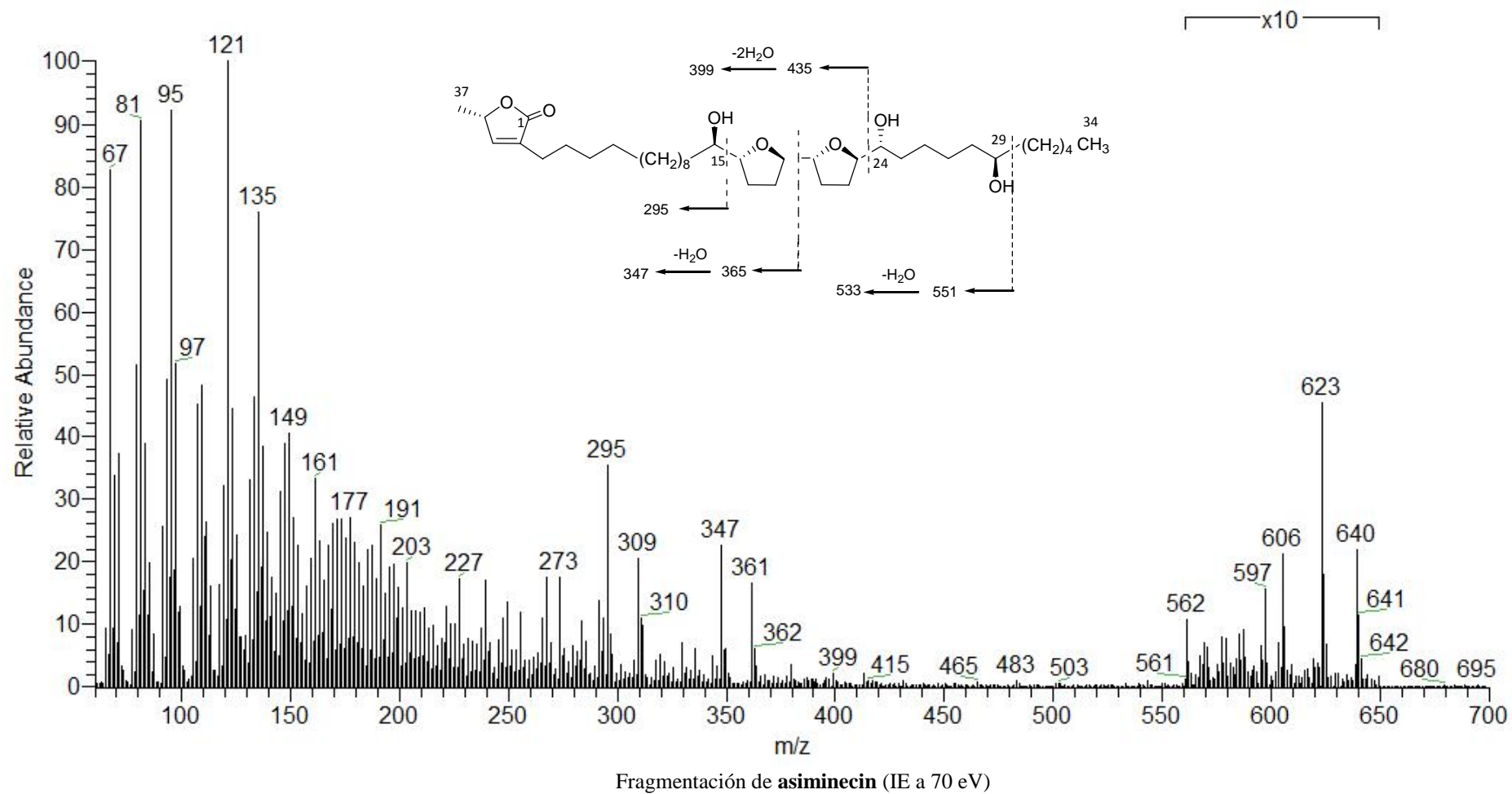
Fragmentación de **squamocin** (IE, 70 eV)

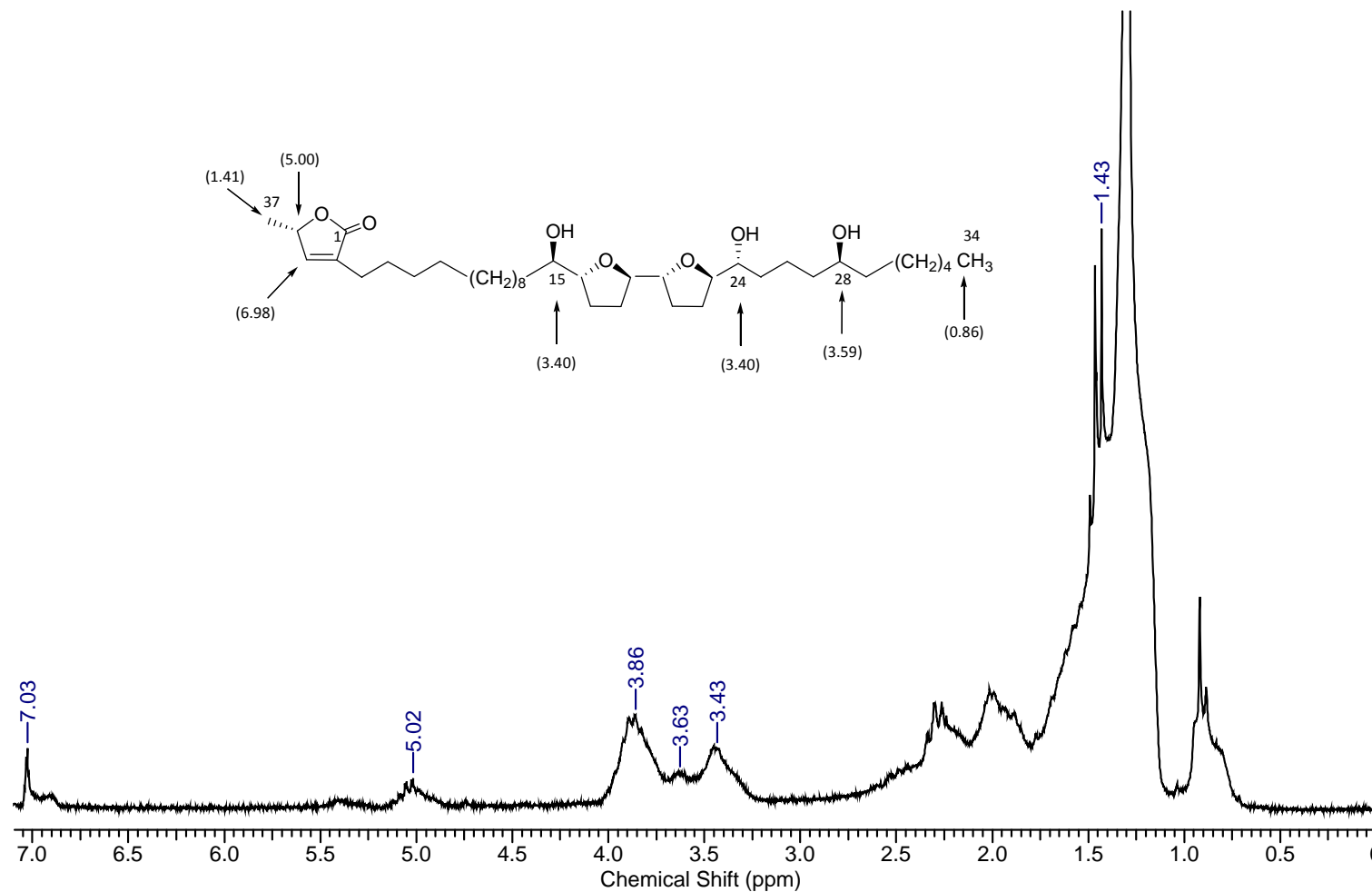


$^1\text{H}$ -RMN de **asiminecin** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

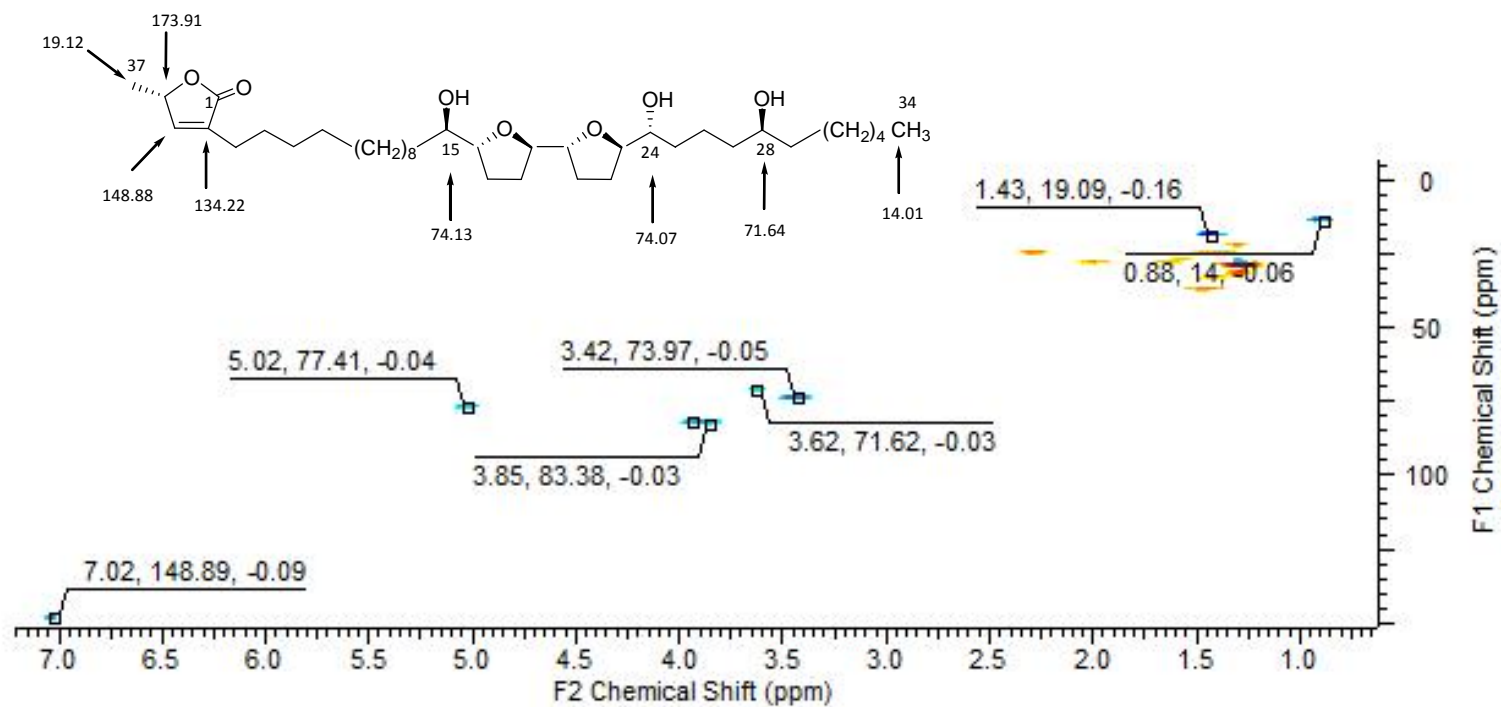


HSQC de **asiminecin** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



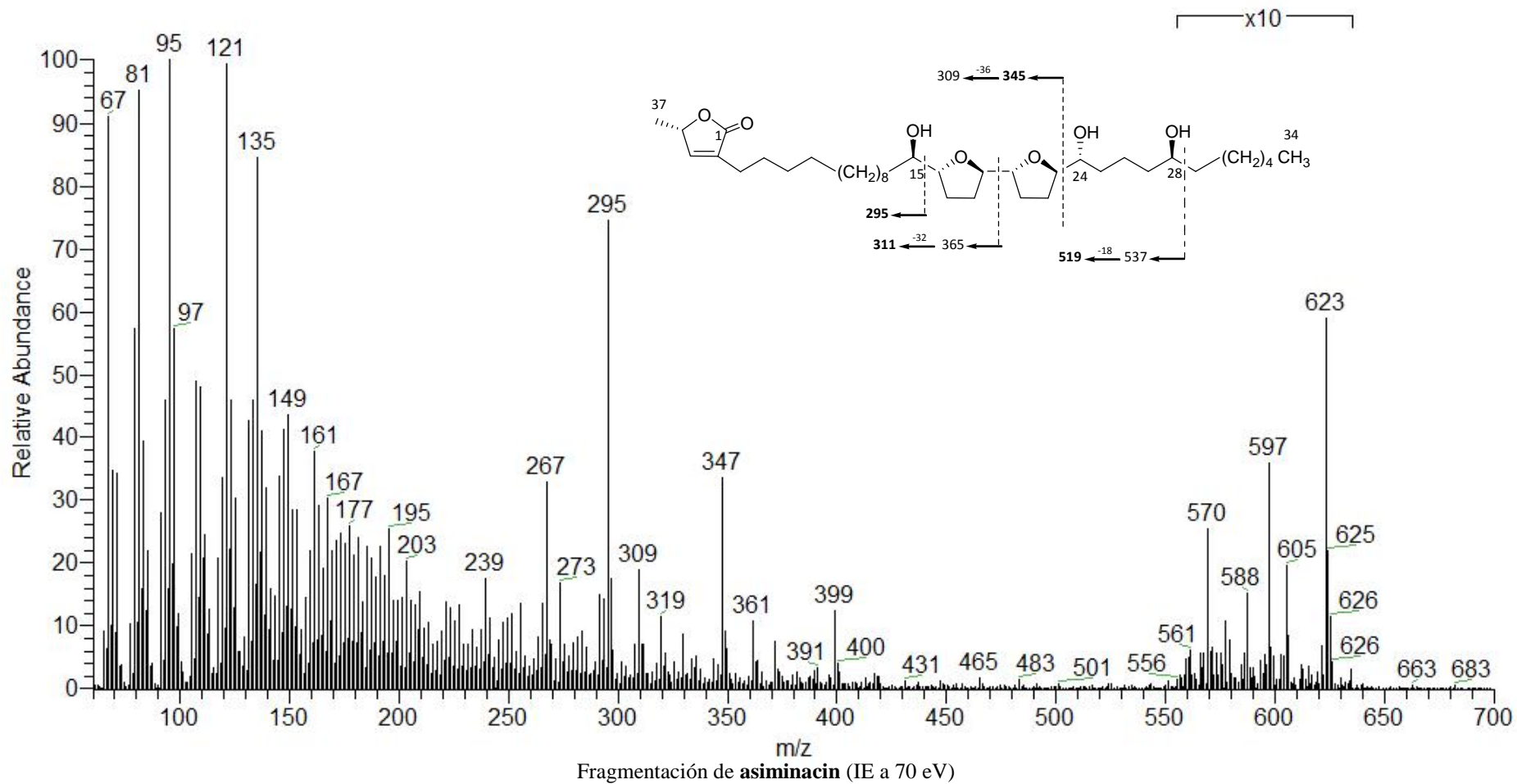


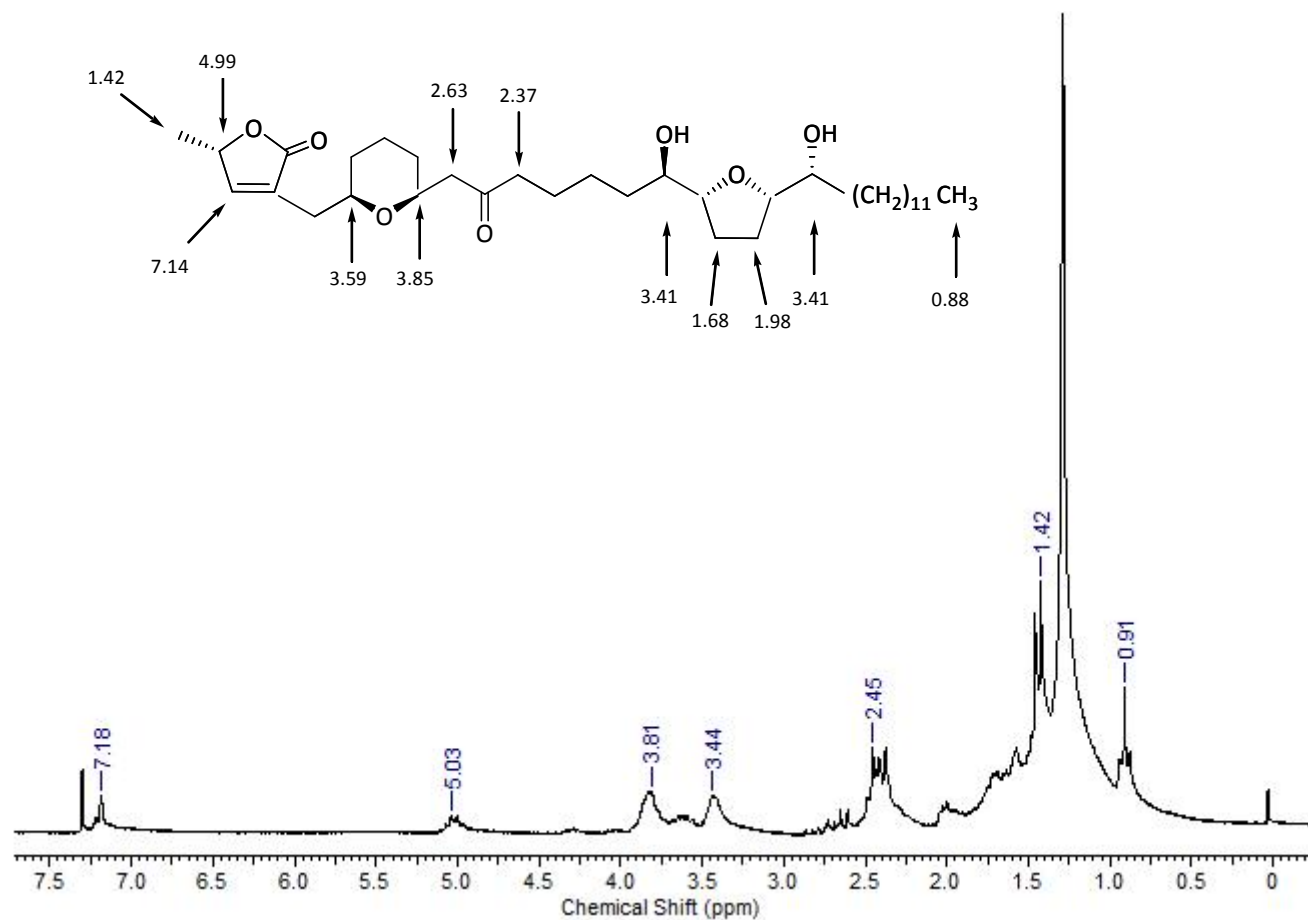
<sup>1</sup>H-RMN de **asiminacin** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



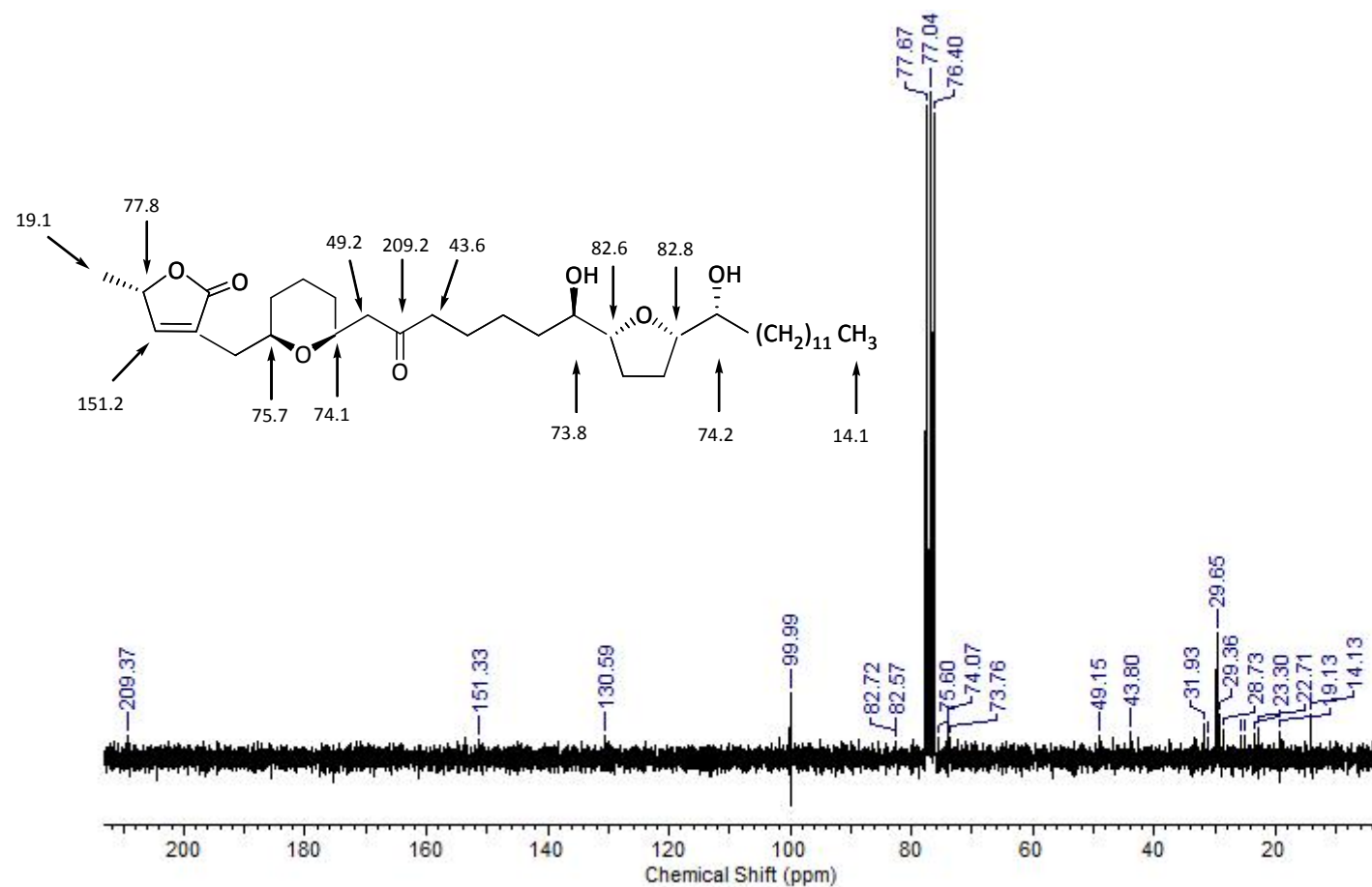
HSQC de **asiminacin** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



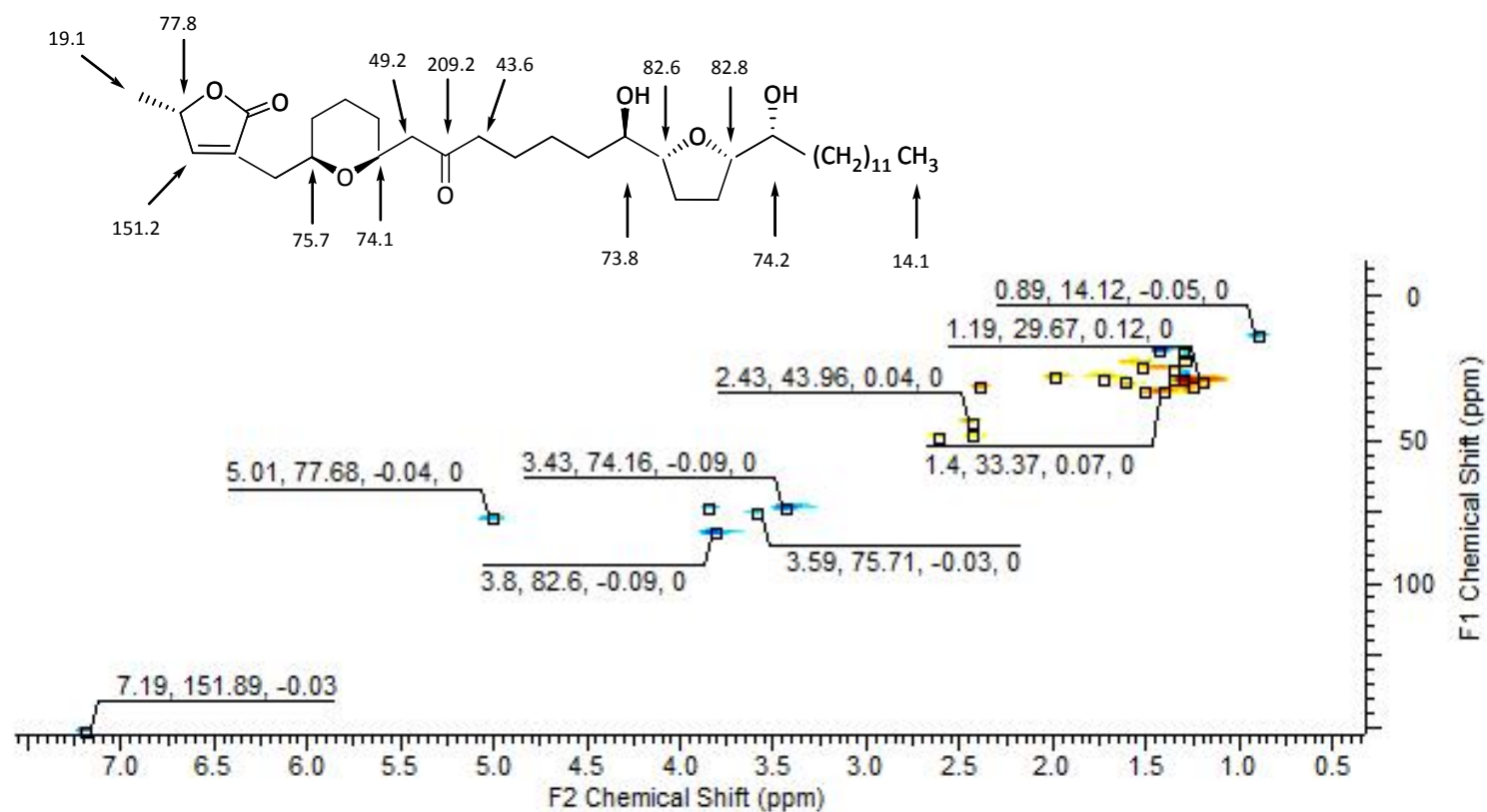




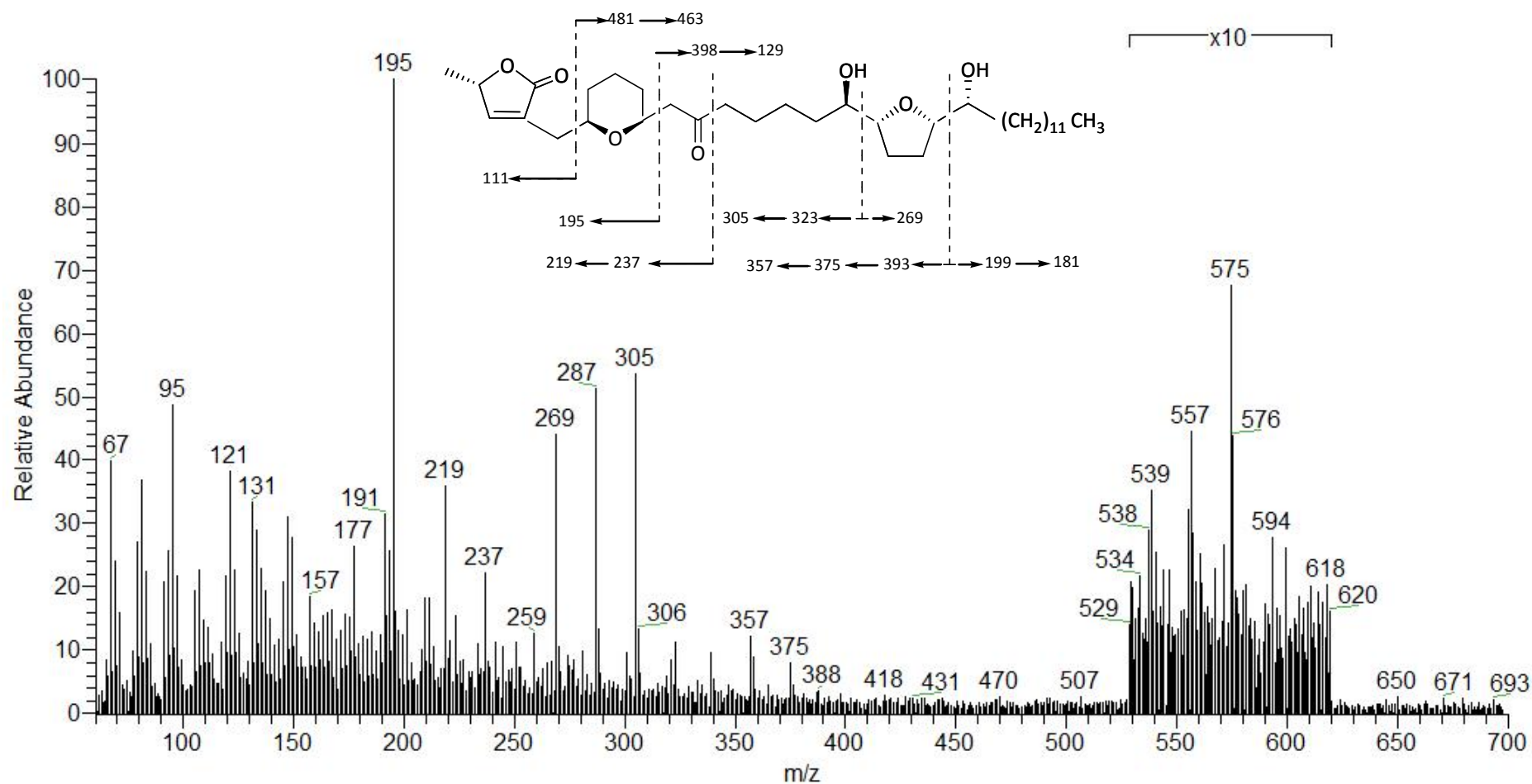
<sup>1</sup>H-RMN de **montanacin-D** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



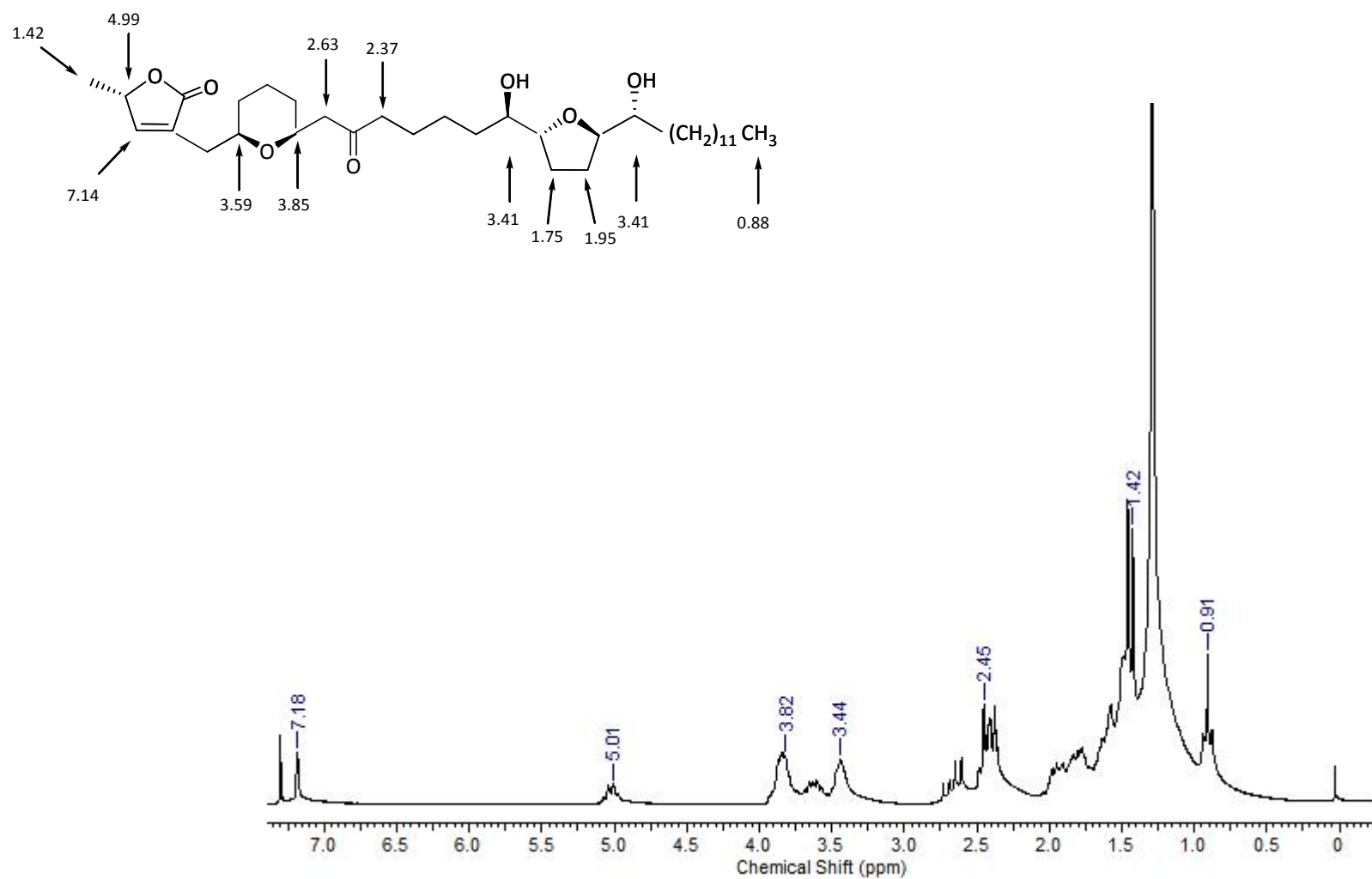
$^{13}\text{C}$ -RMN de **montanacin-D** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)



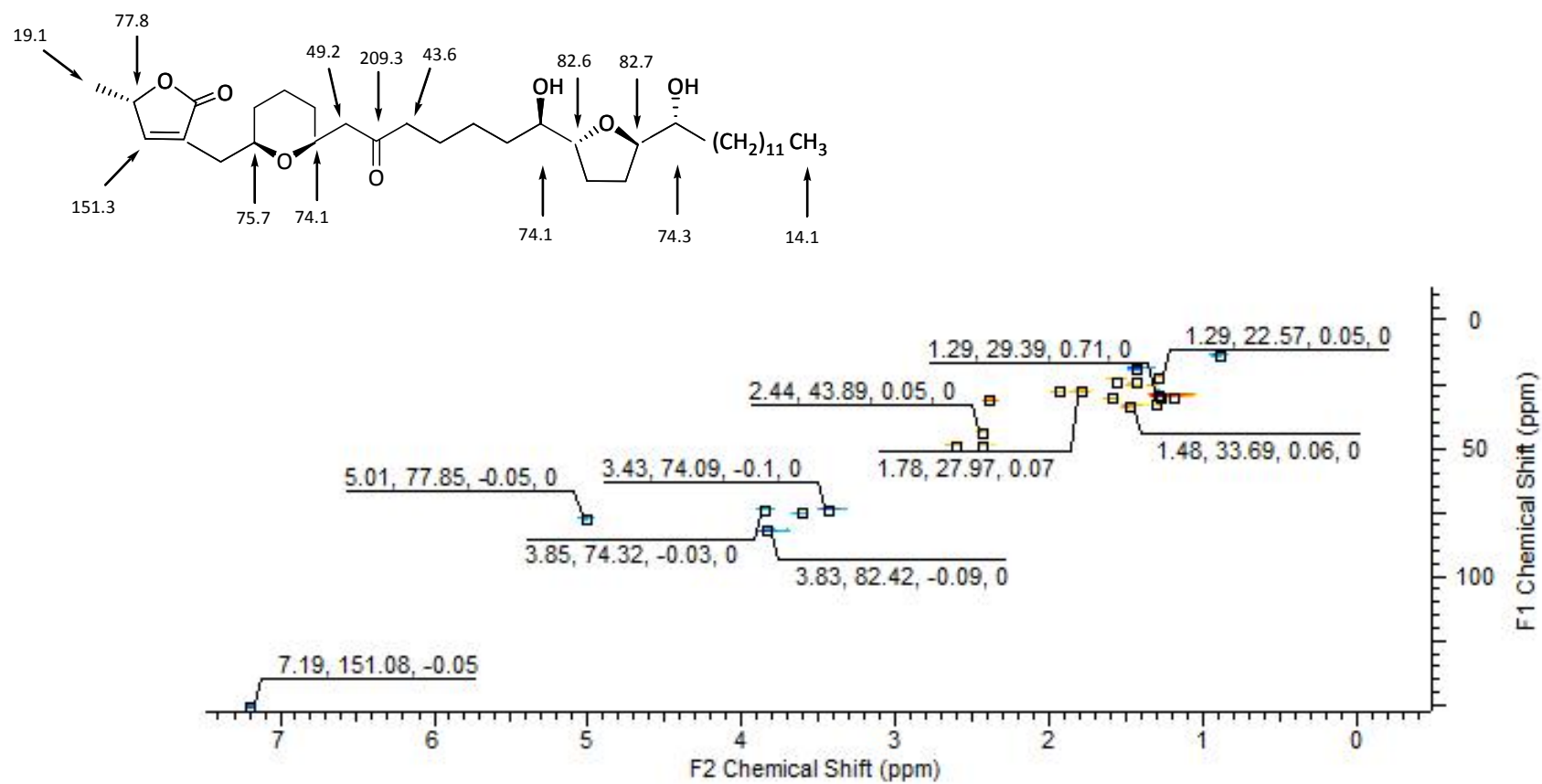
HSQC de **montanacin-D** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



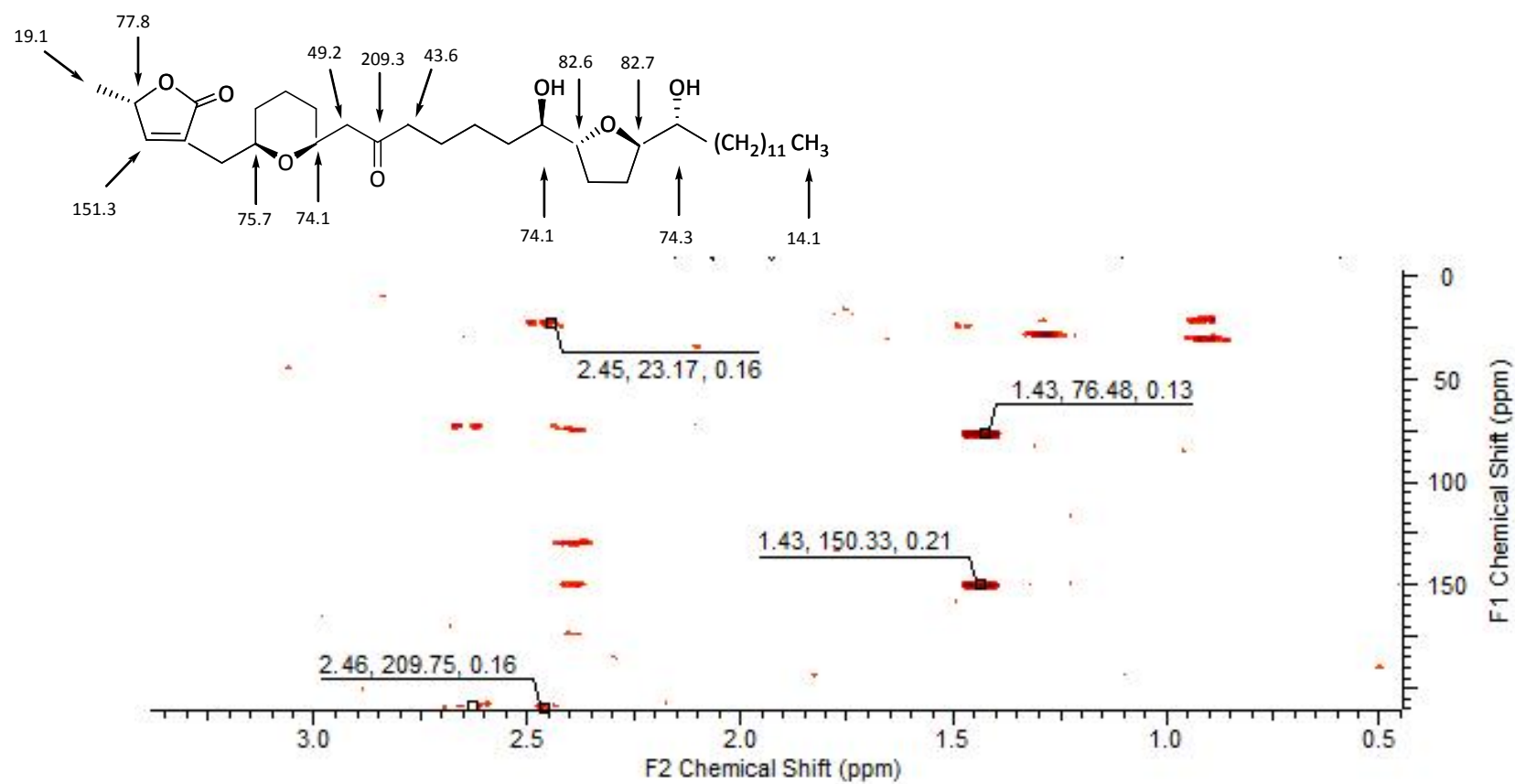
Fragmentación de **montanacin-D** (IE a 70 eV)



<sup>1</sup>H-RMN de **montanacin-E** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

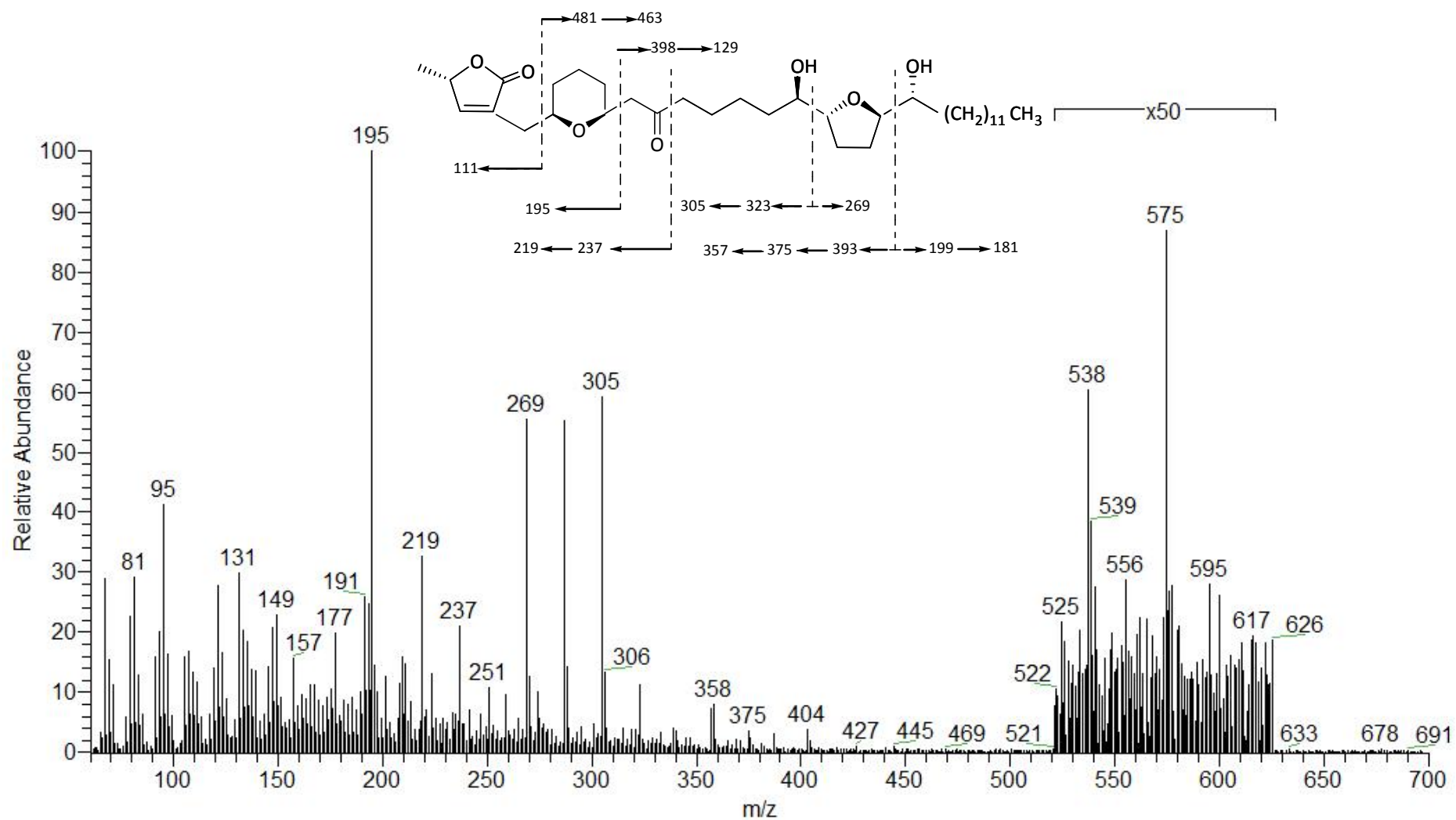


HSQC de **montanacin-E** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

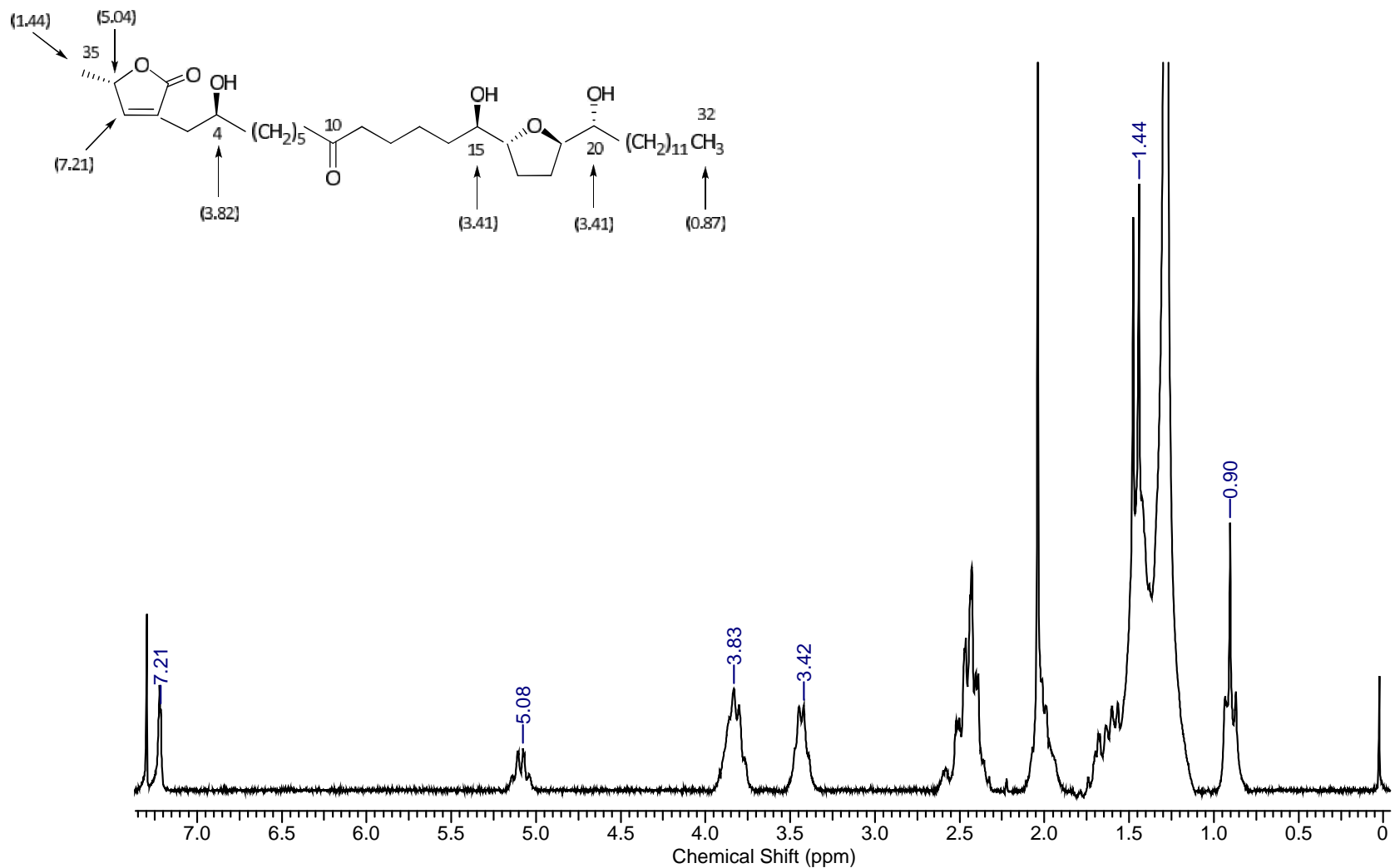


HMBC de **montanacin-E** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

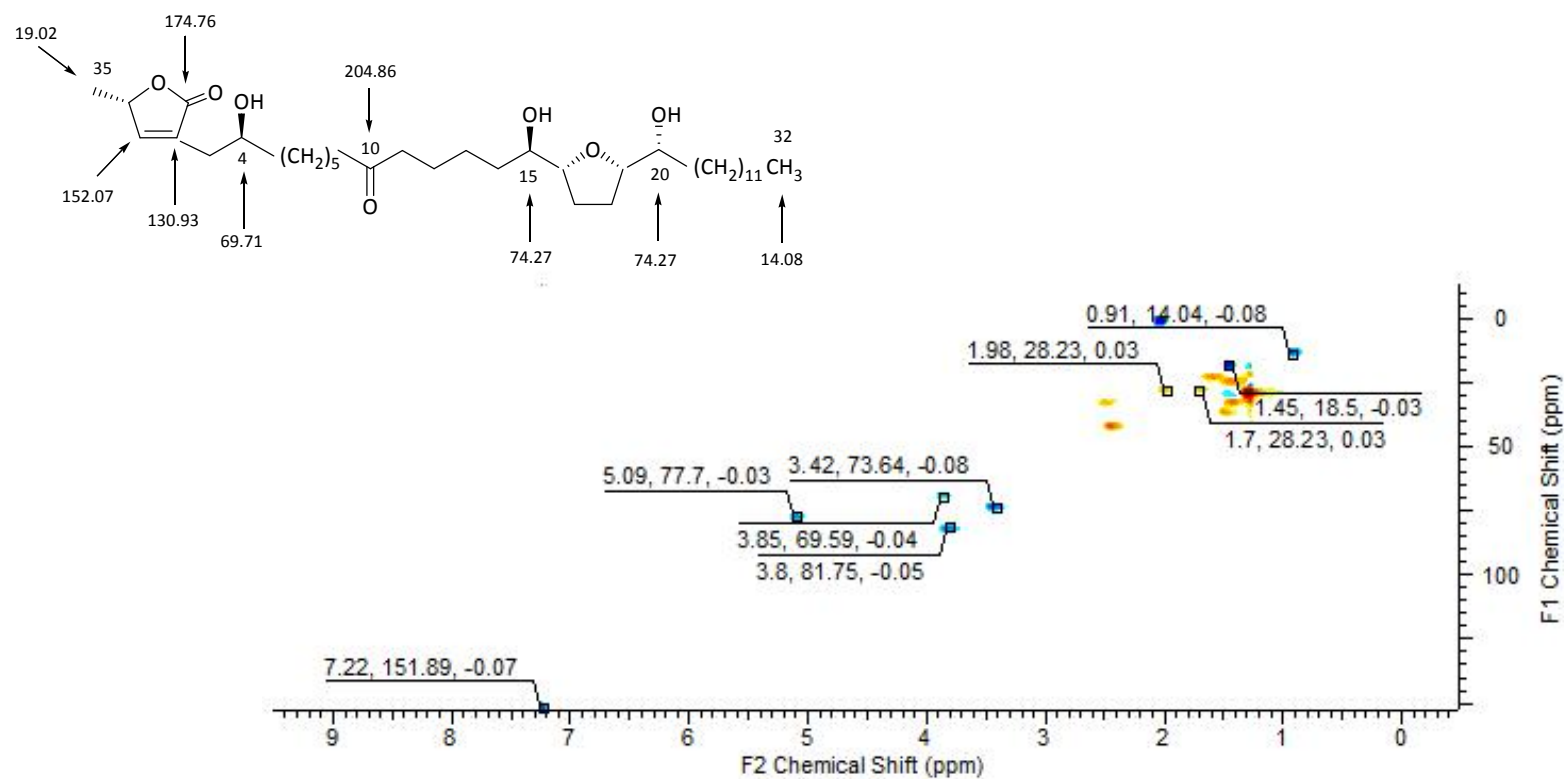




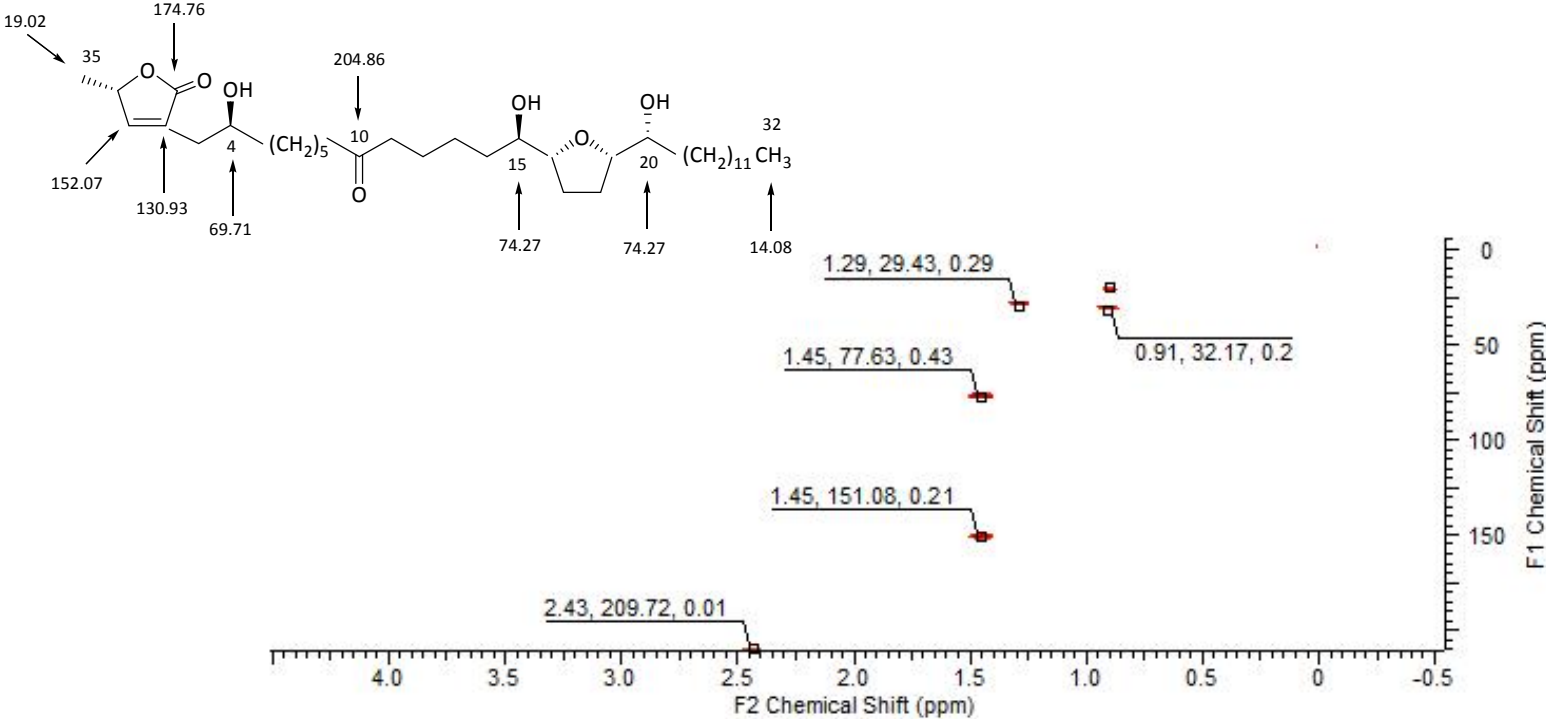
Fragmentación de **montanacin-E** (IE a 70 eV)



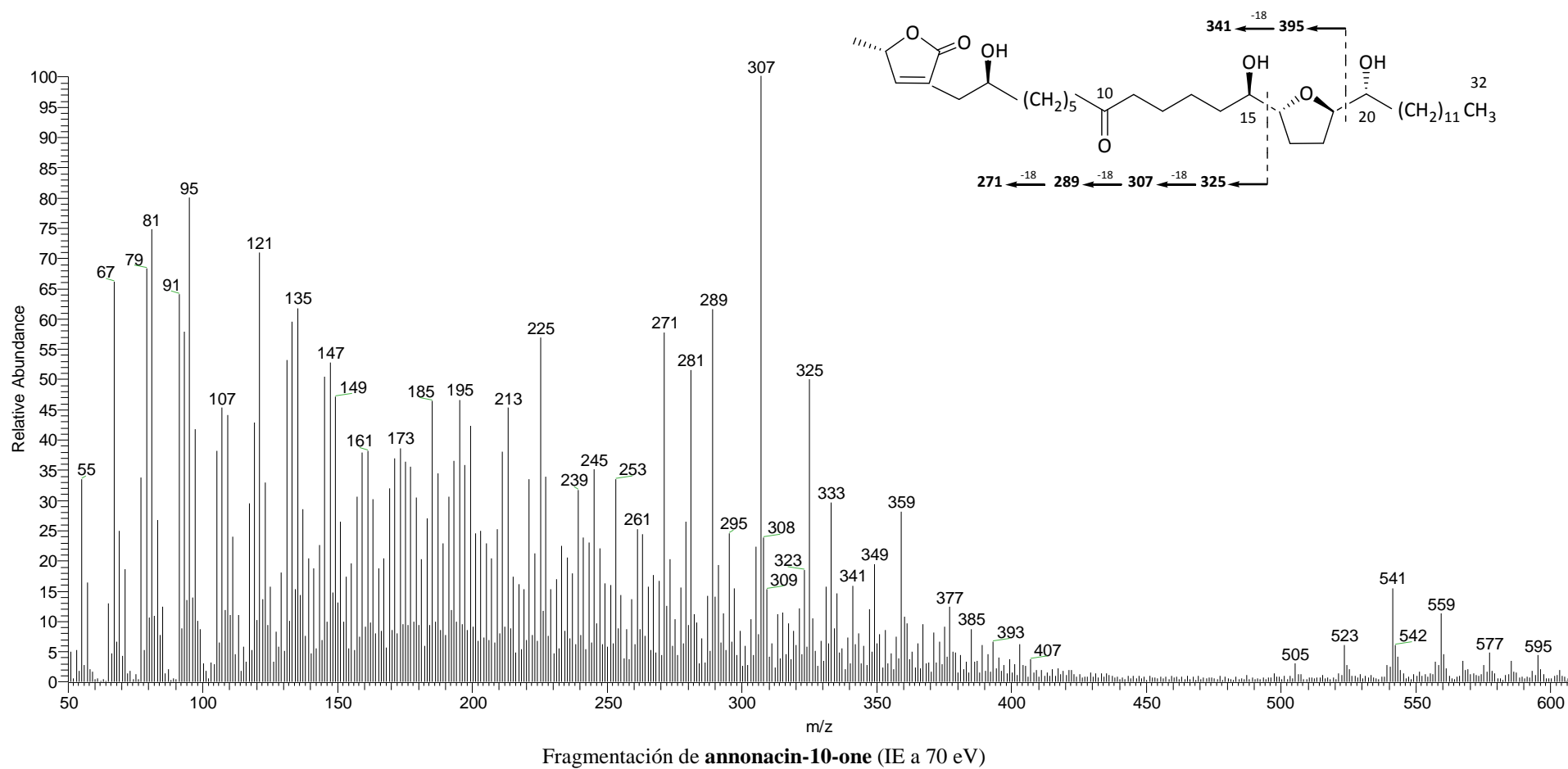
$^1\text{H}$ -RMN de **annonacin-10-one** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

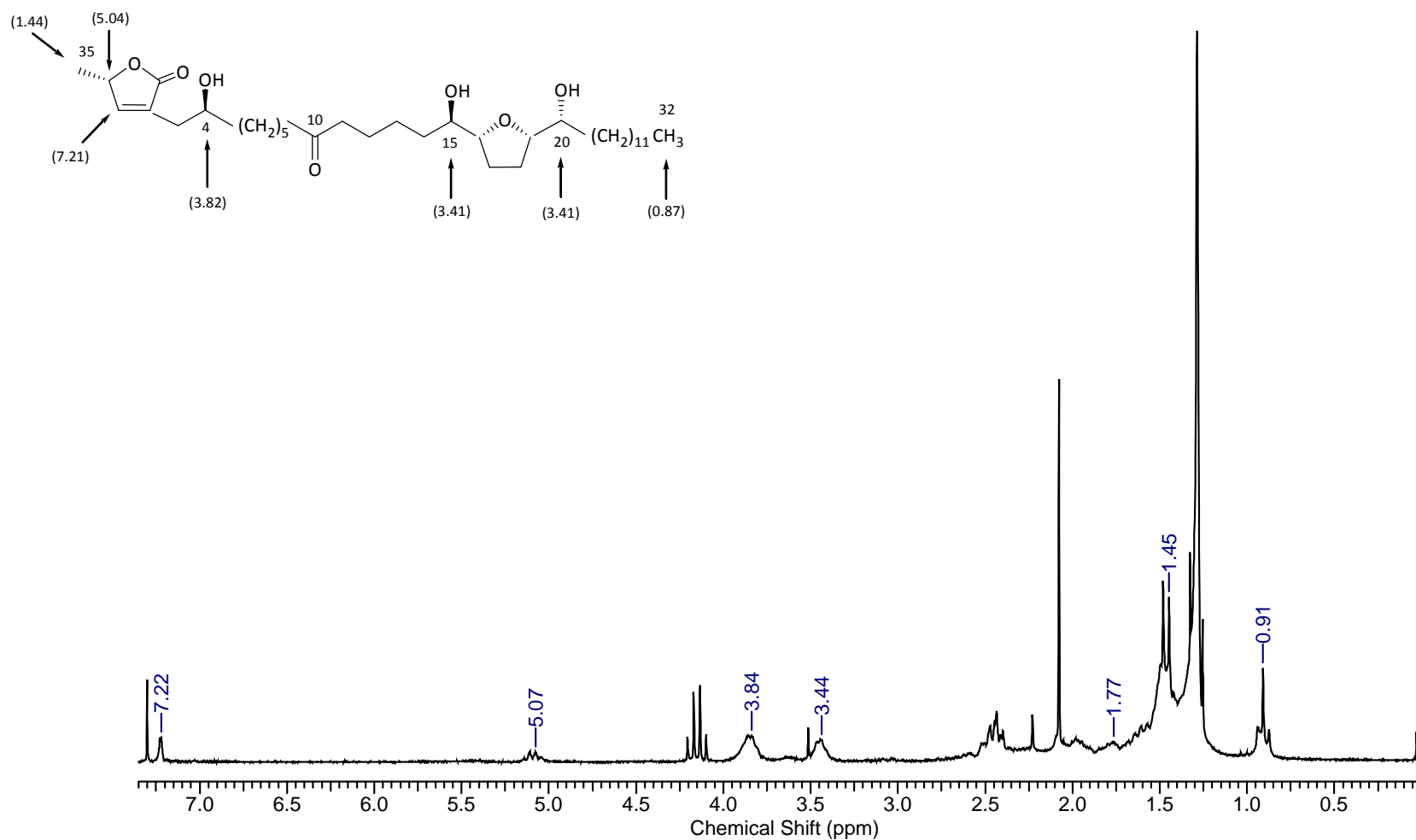


HSQC de **annonacin-10-one** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

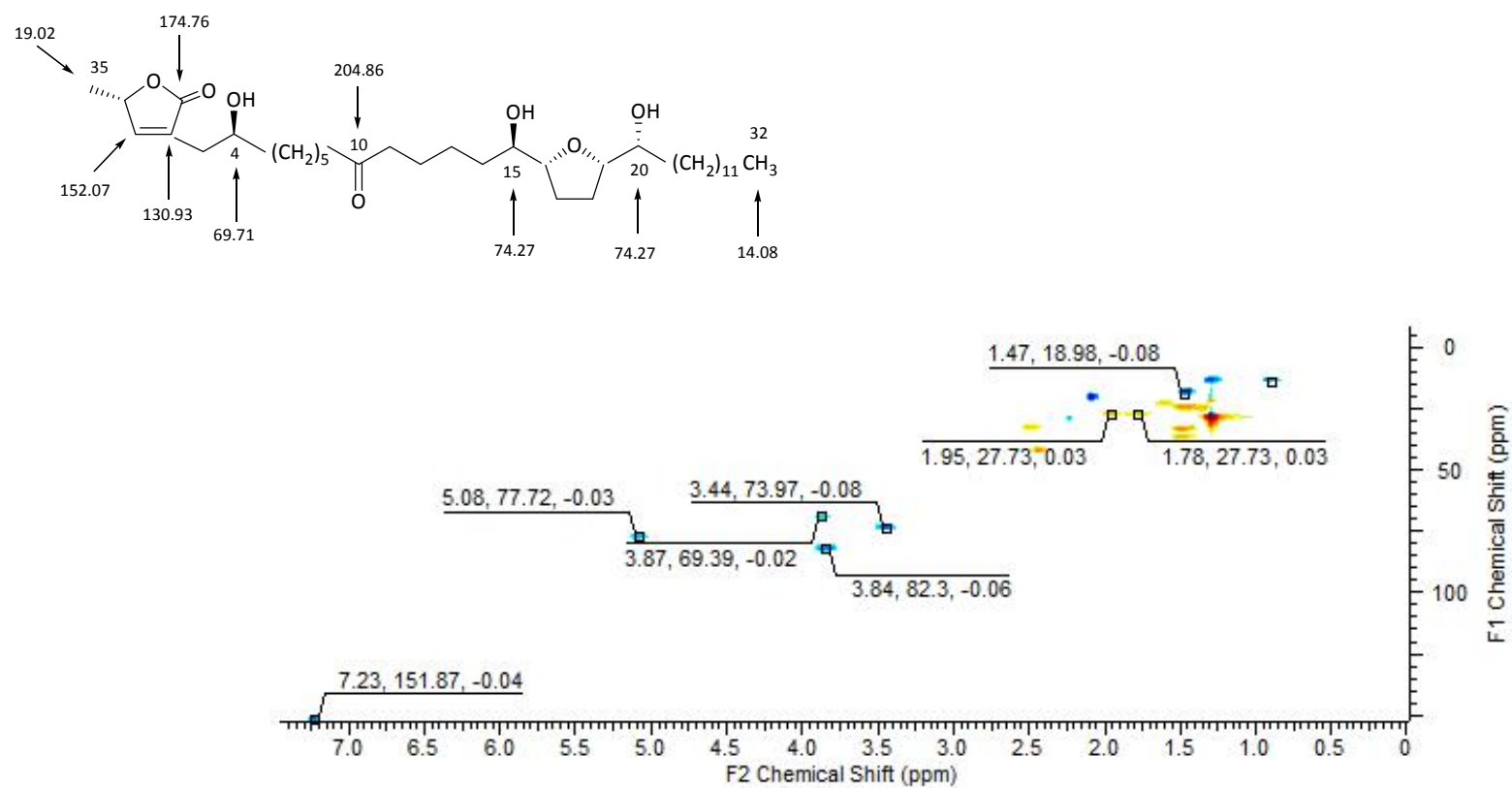


HMBC de **annonacin-10-one** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

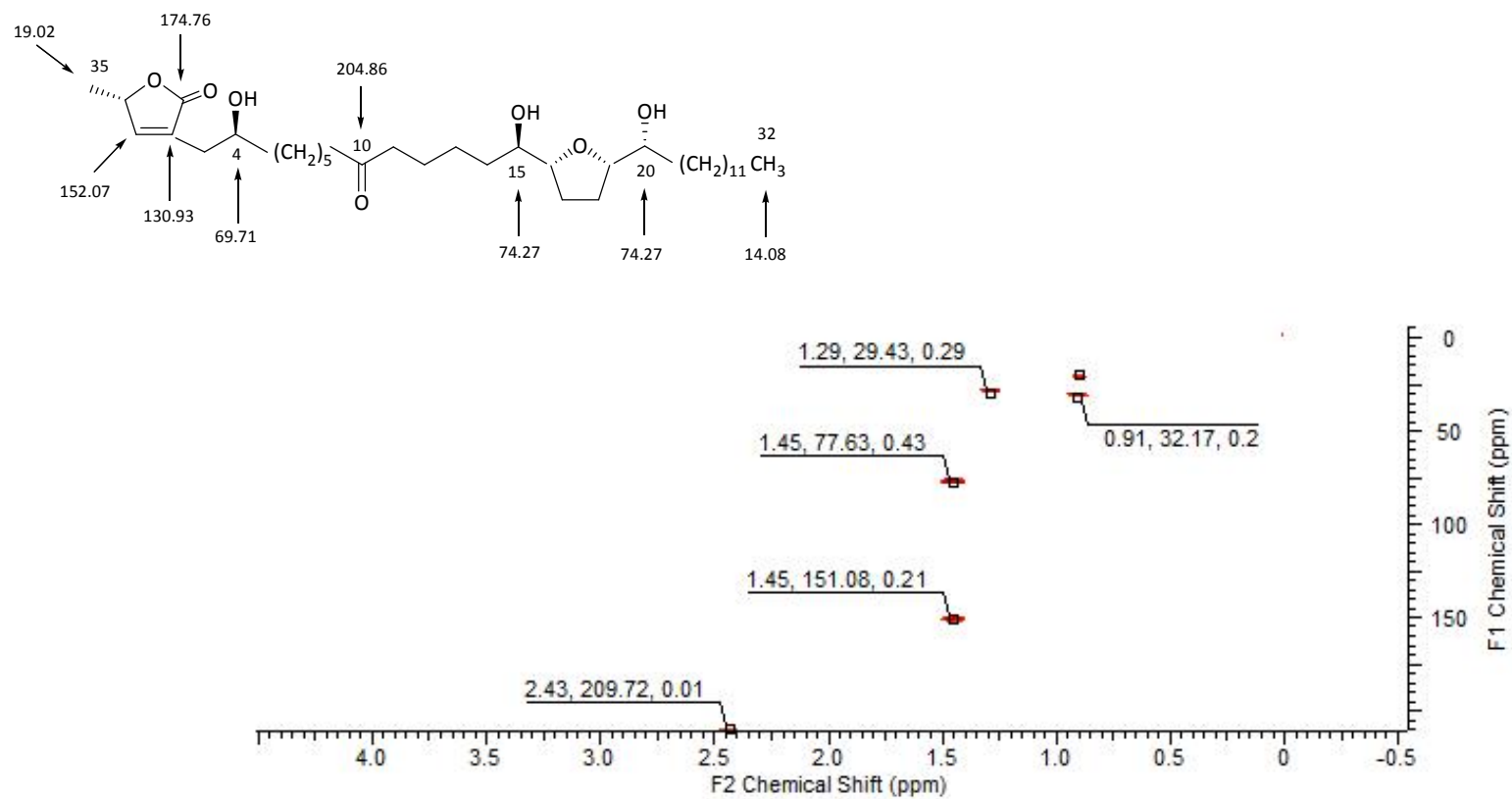




<sup>1</sup>H-RMN de *cis*-annonacin-10-one (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

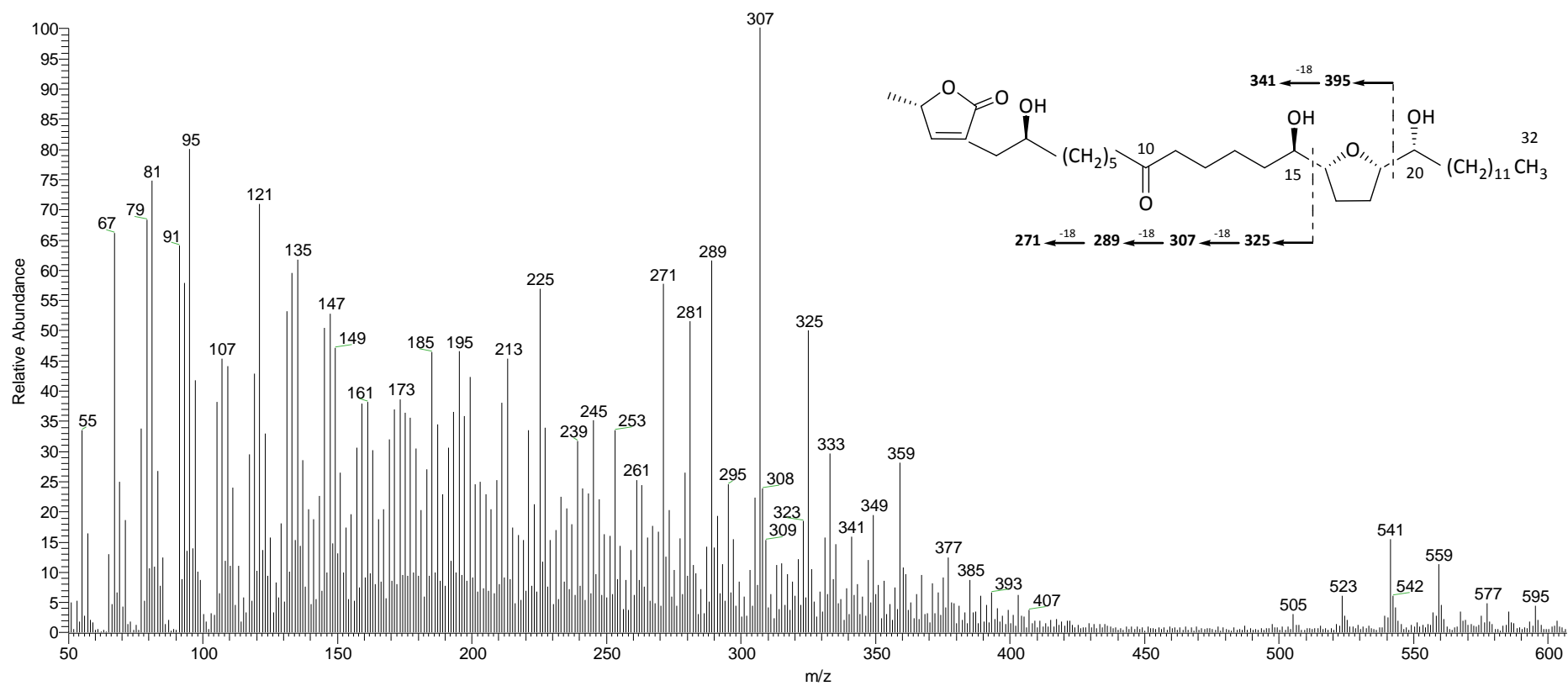


HSQC de *cis*-annonacin-10-one (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

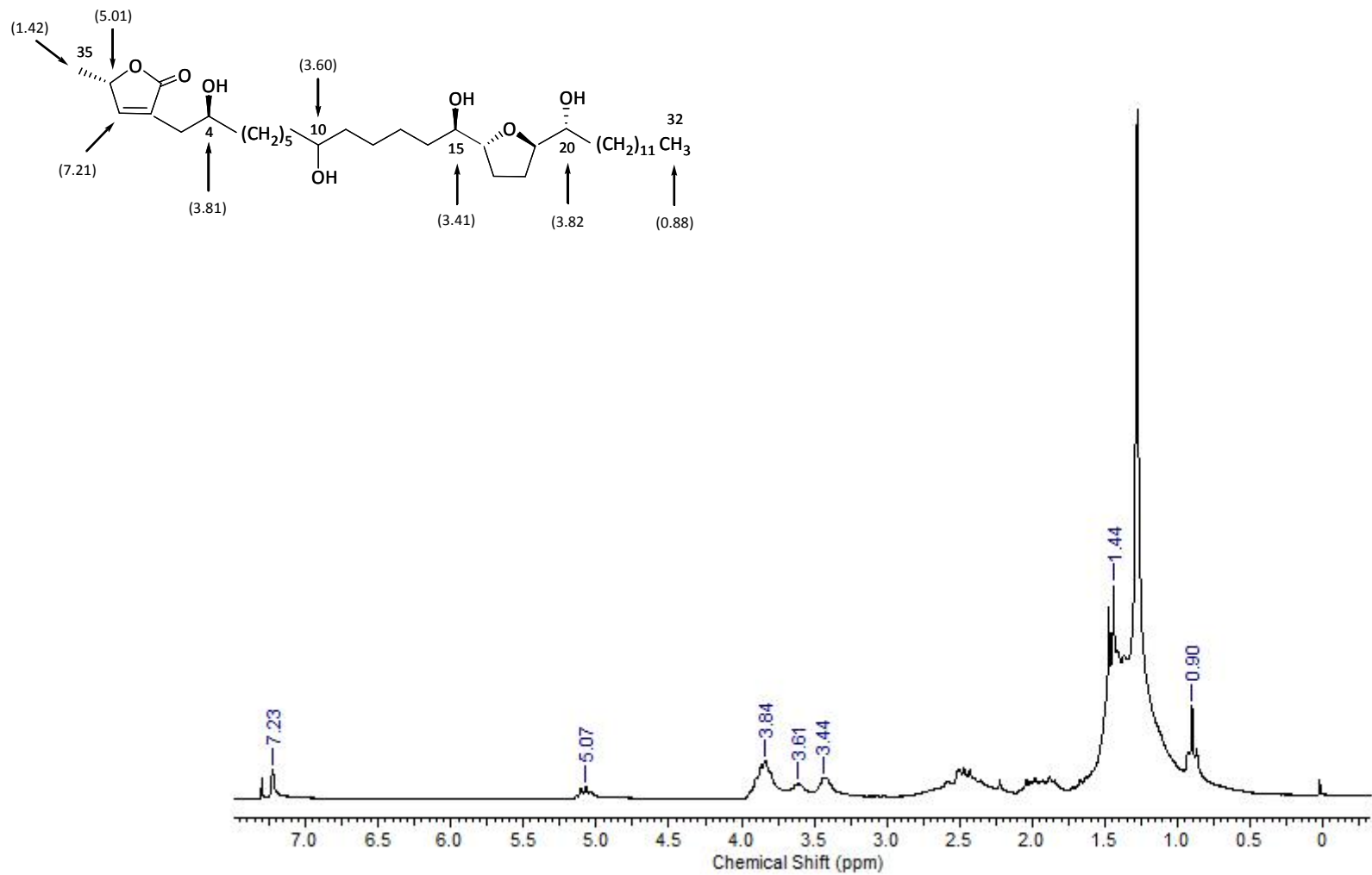


HMBC de *cis*-annonacin-10-one (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

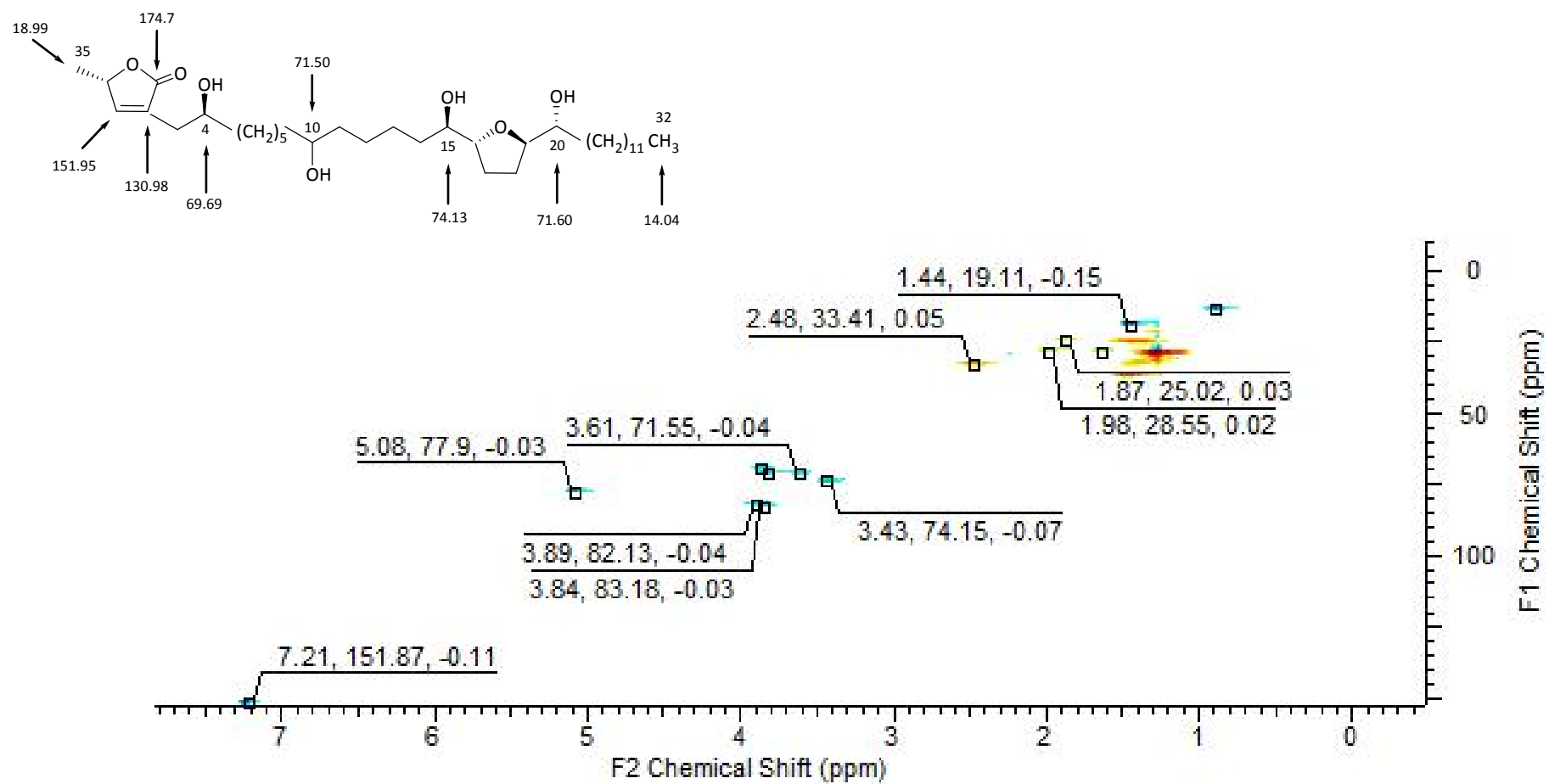




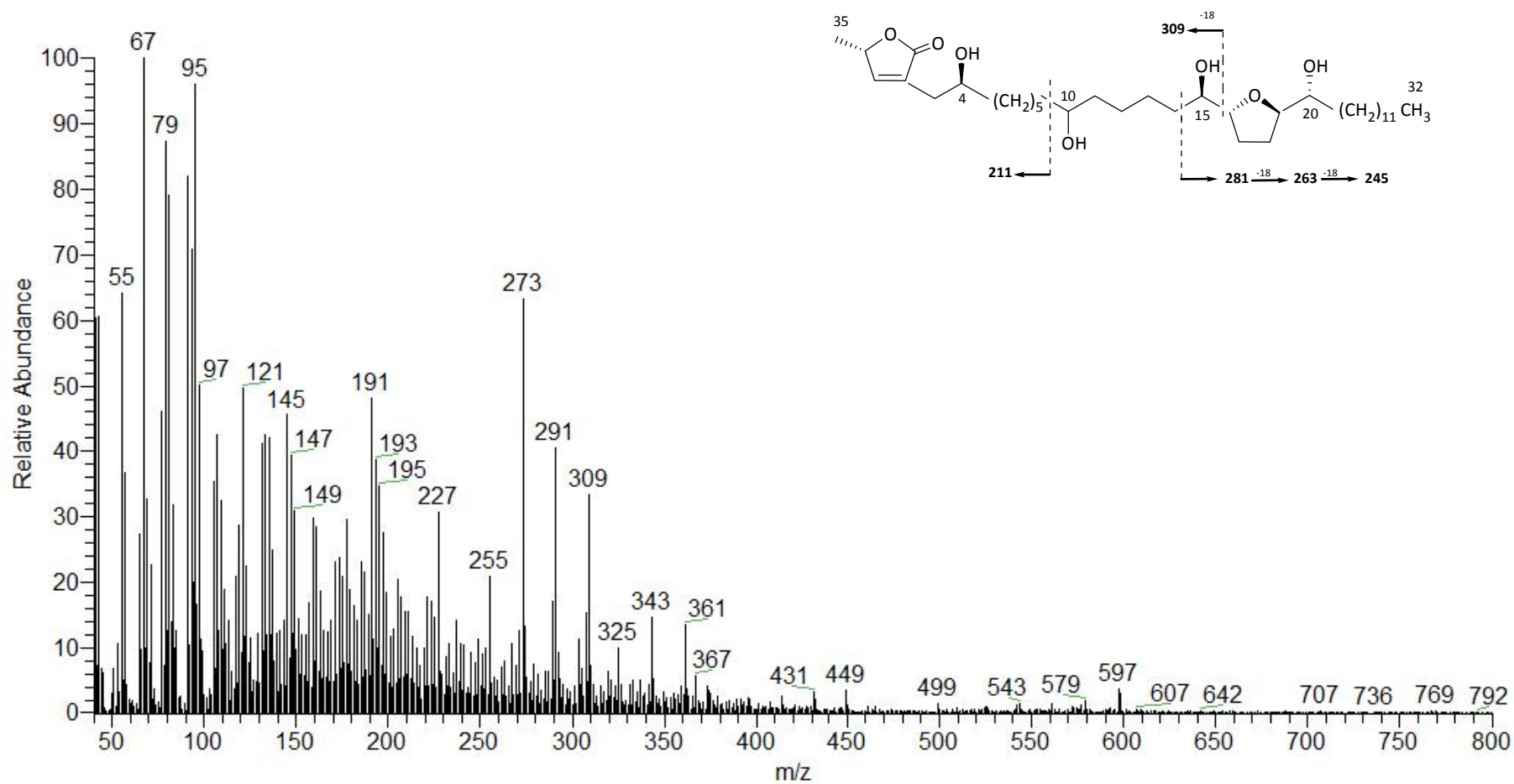
Fragmentación de *cis*-annonacin-10-one (IE a 70 eV)



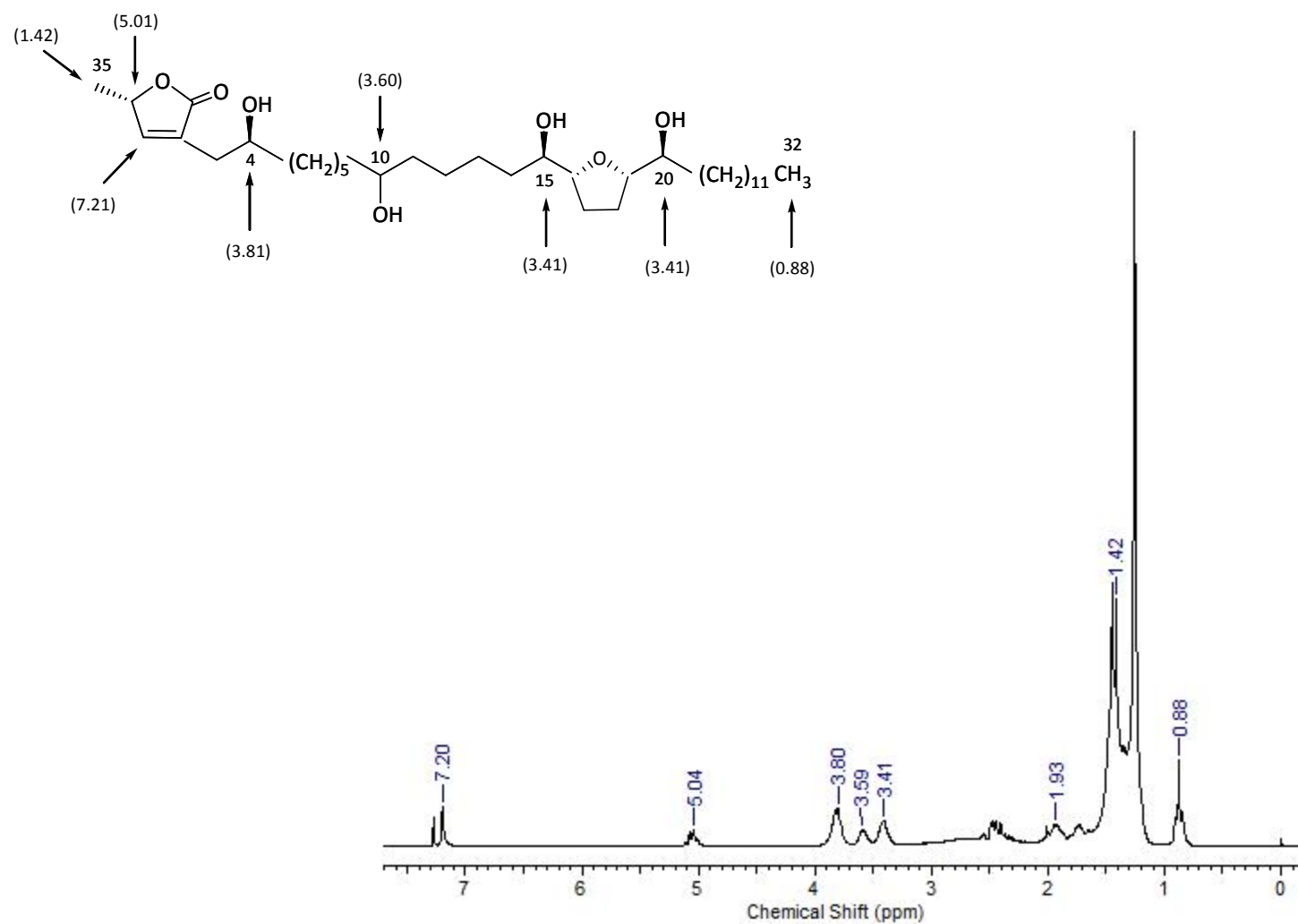
$^1\text{H}$ -RMN de **annonacin-A** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



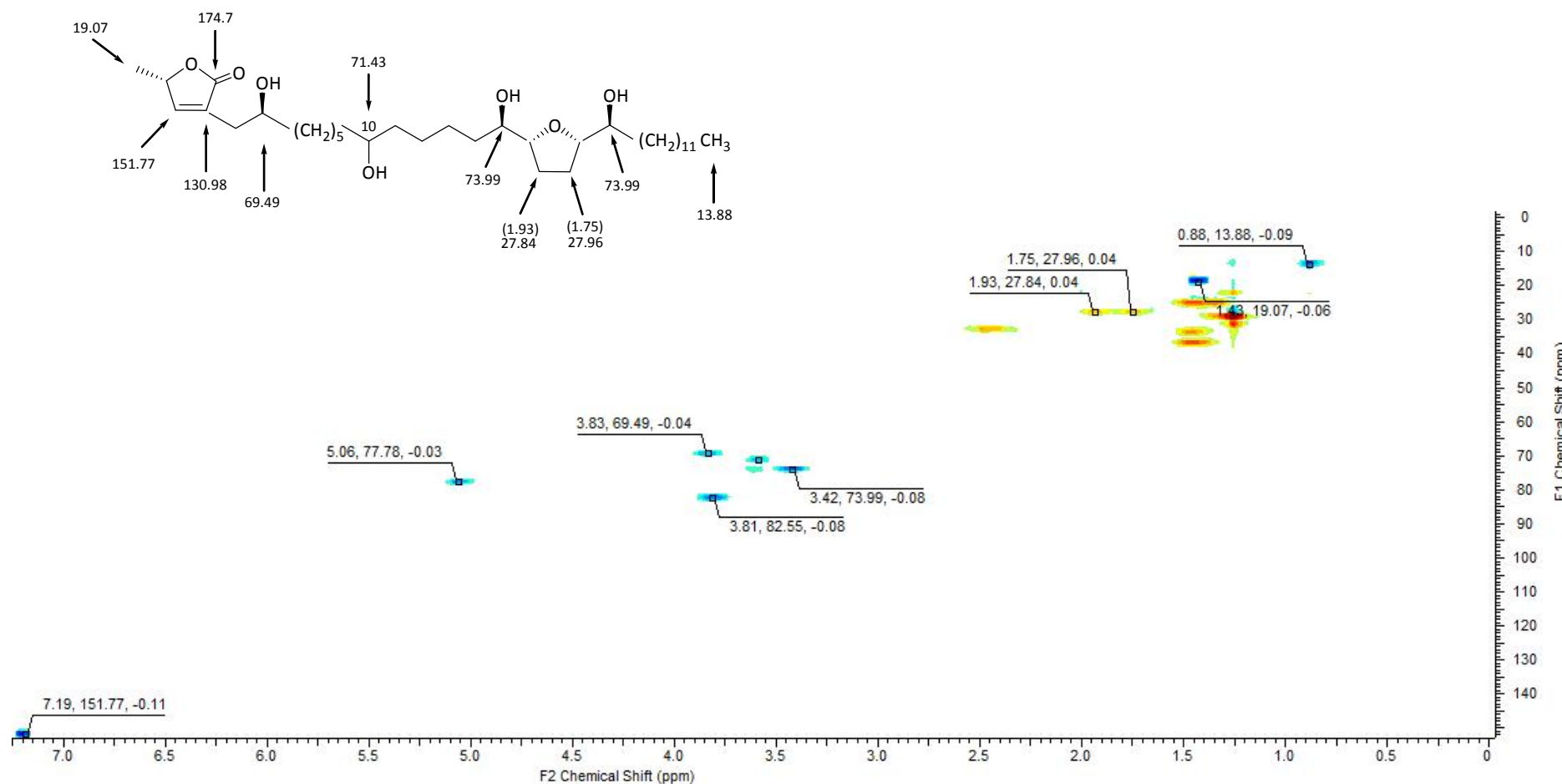
HSQC de **annonacin-A** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)



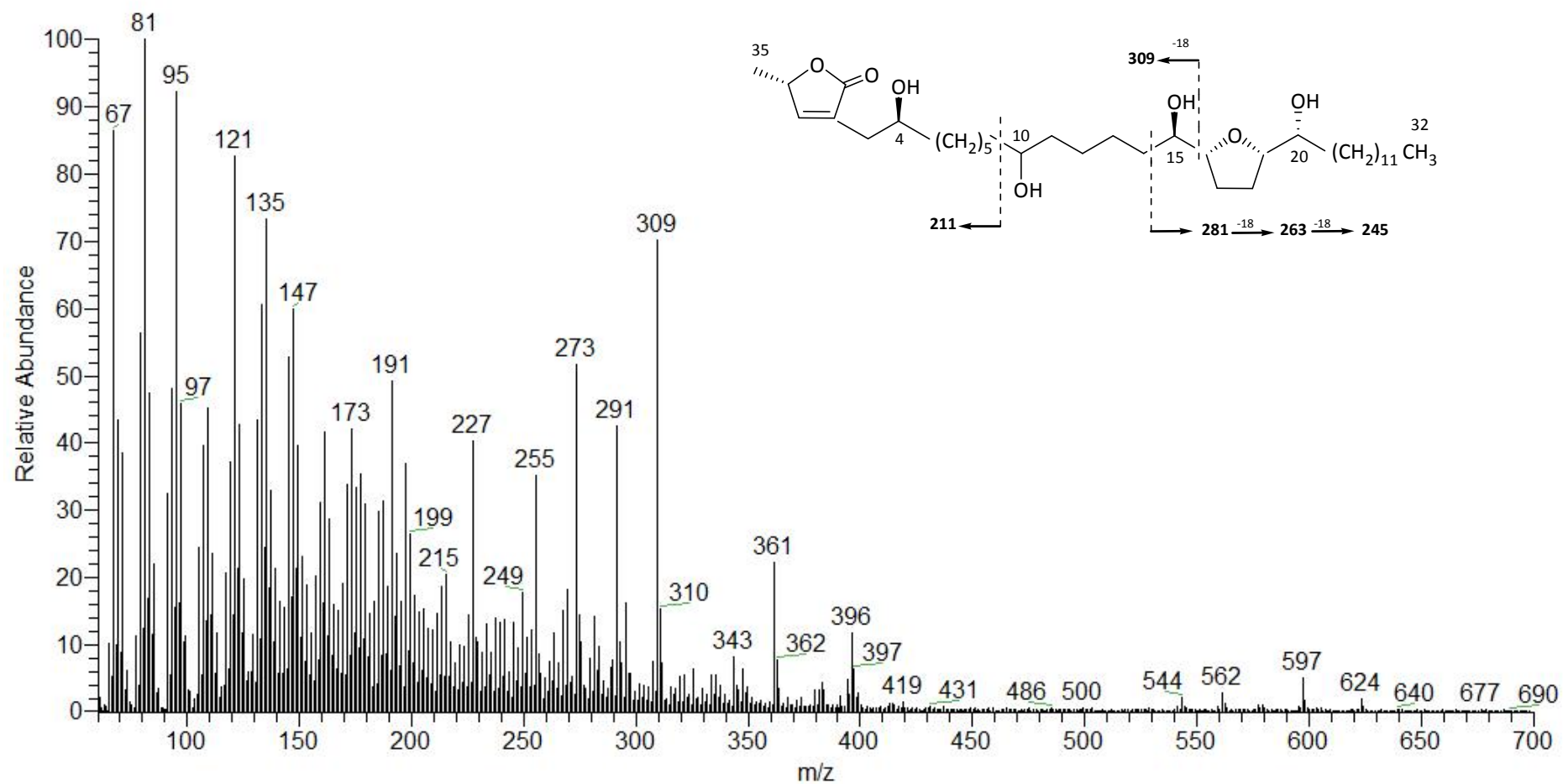
Fragmentación de **annonacin-A** (IE a 70 eV)



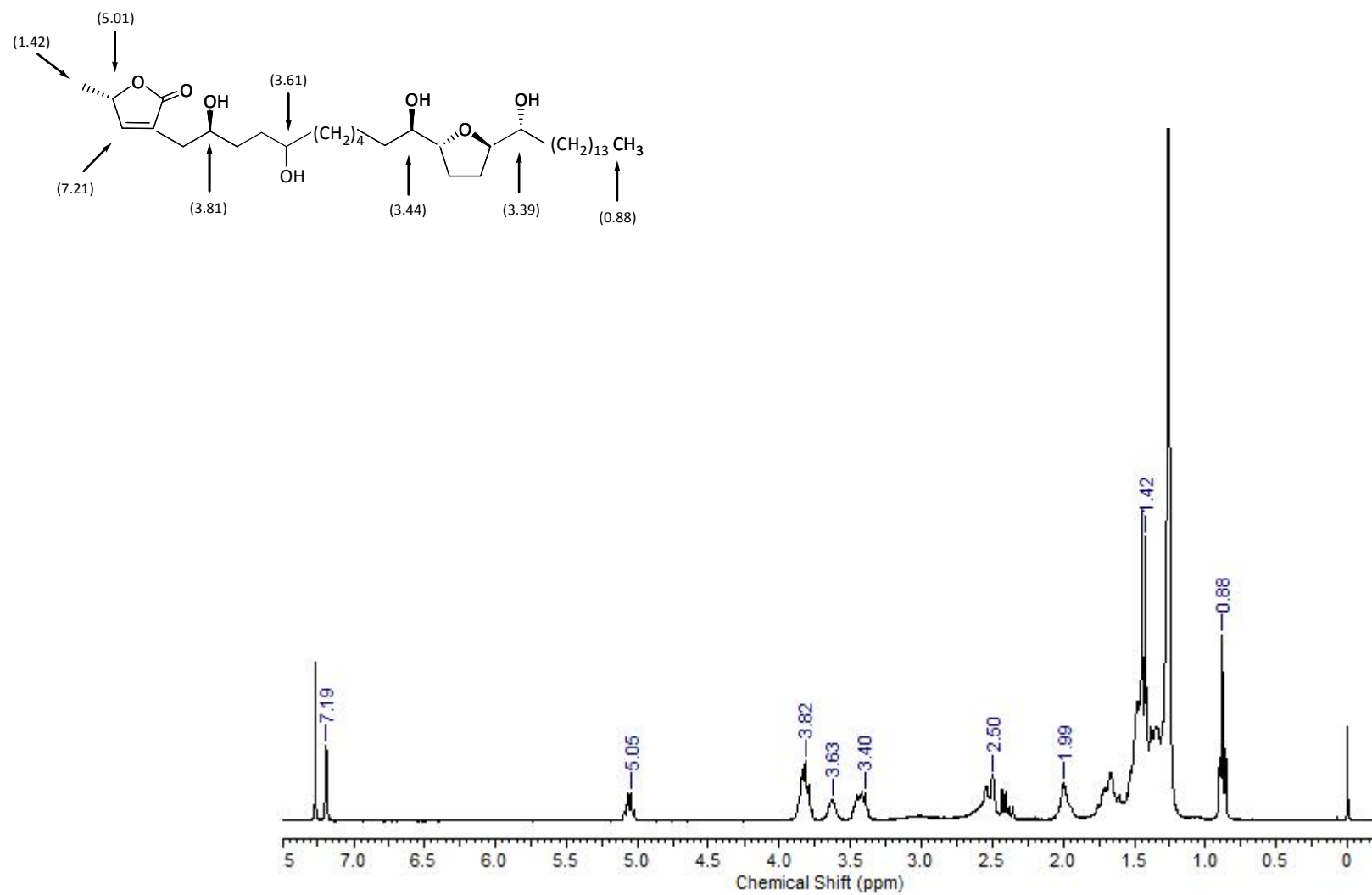
<sup>1</sup>H-RMN de *cis*-annonacin (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



HSQC de *cis*-annonacin ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

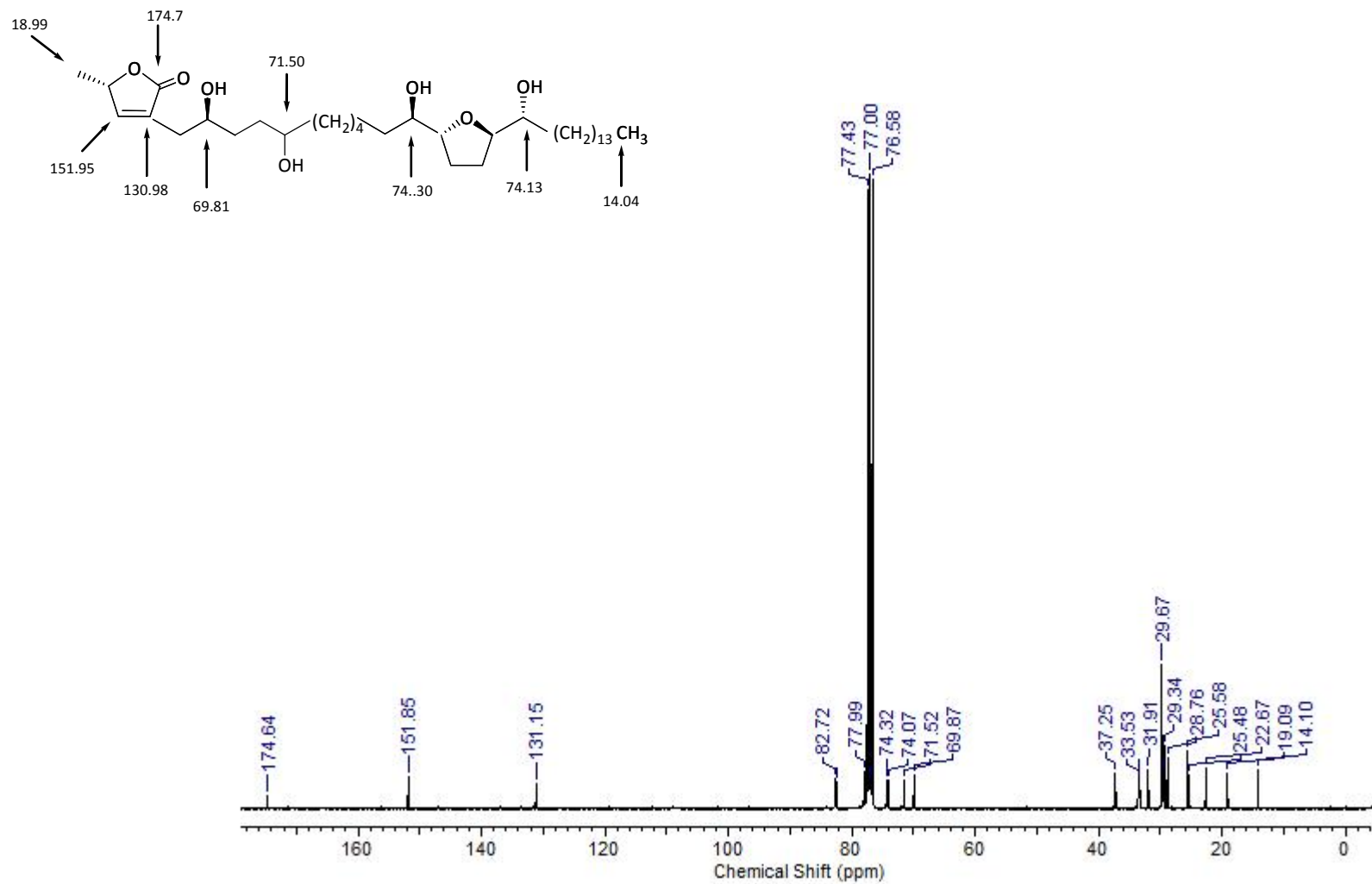


Fragmentación de *cis*-annonacin (IE a 70 eV)

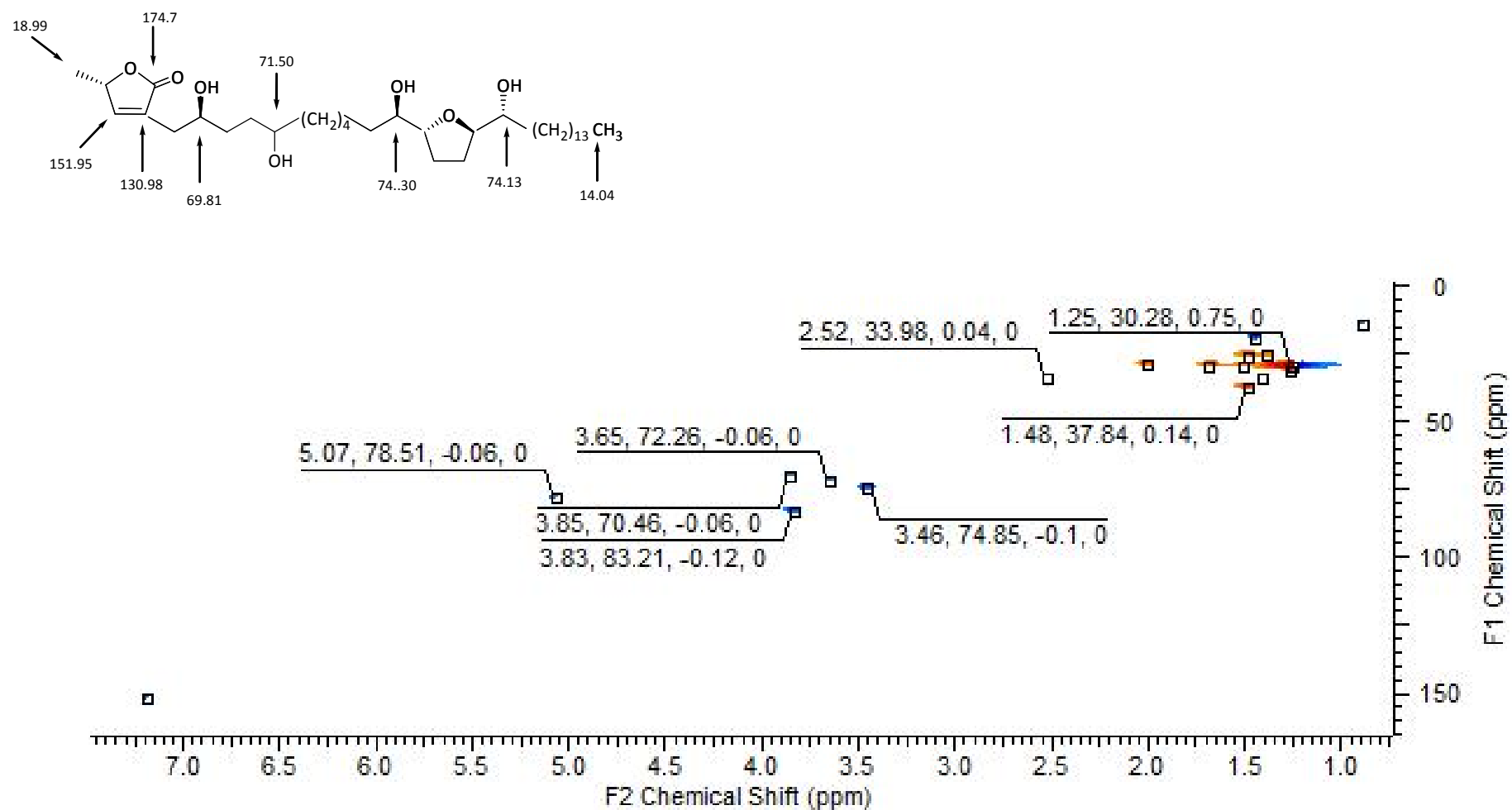


<sup>1</sup>H-RMN de **montalycin-C** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

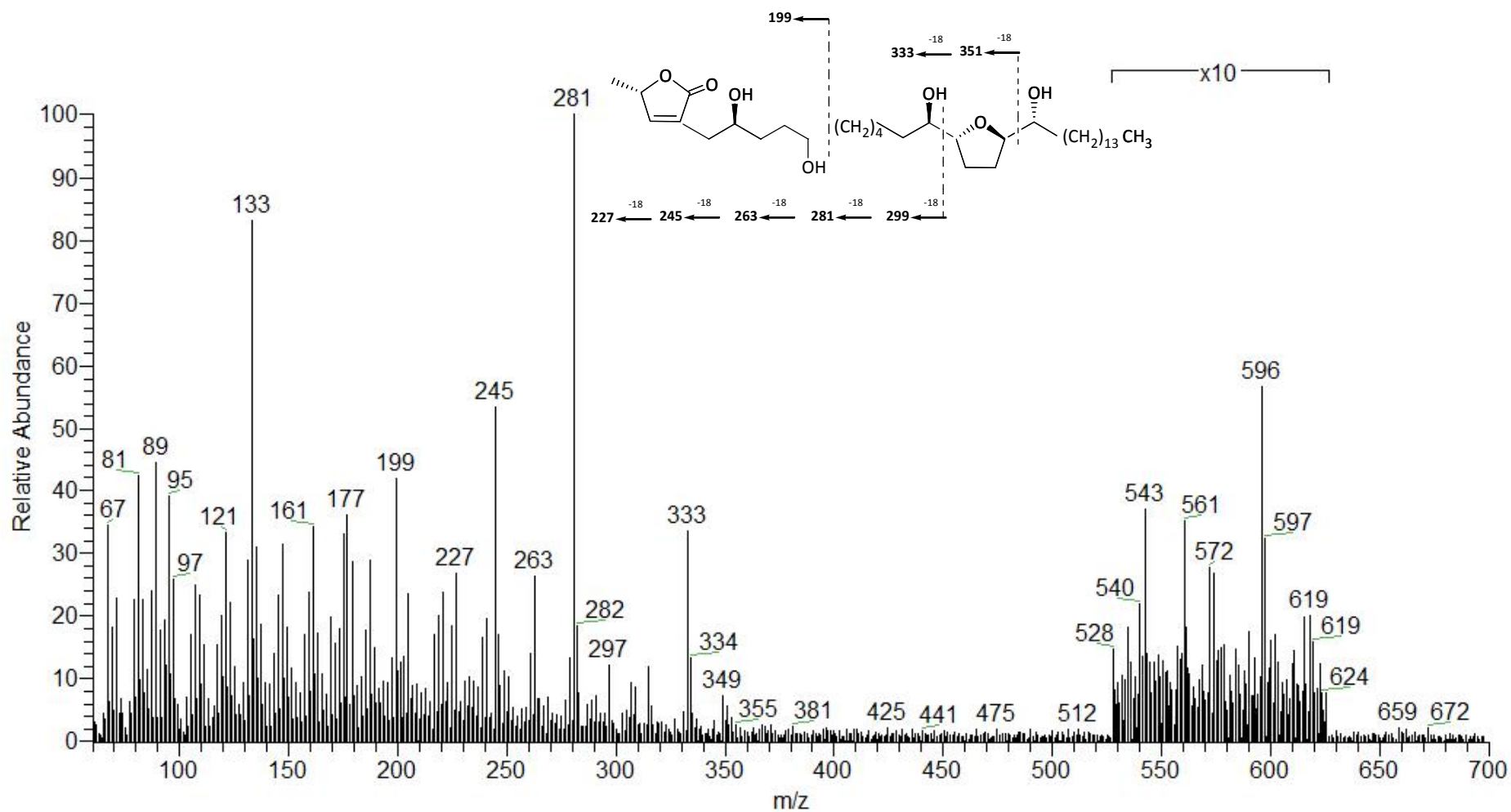




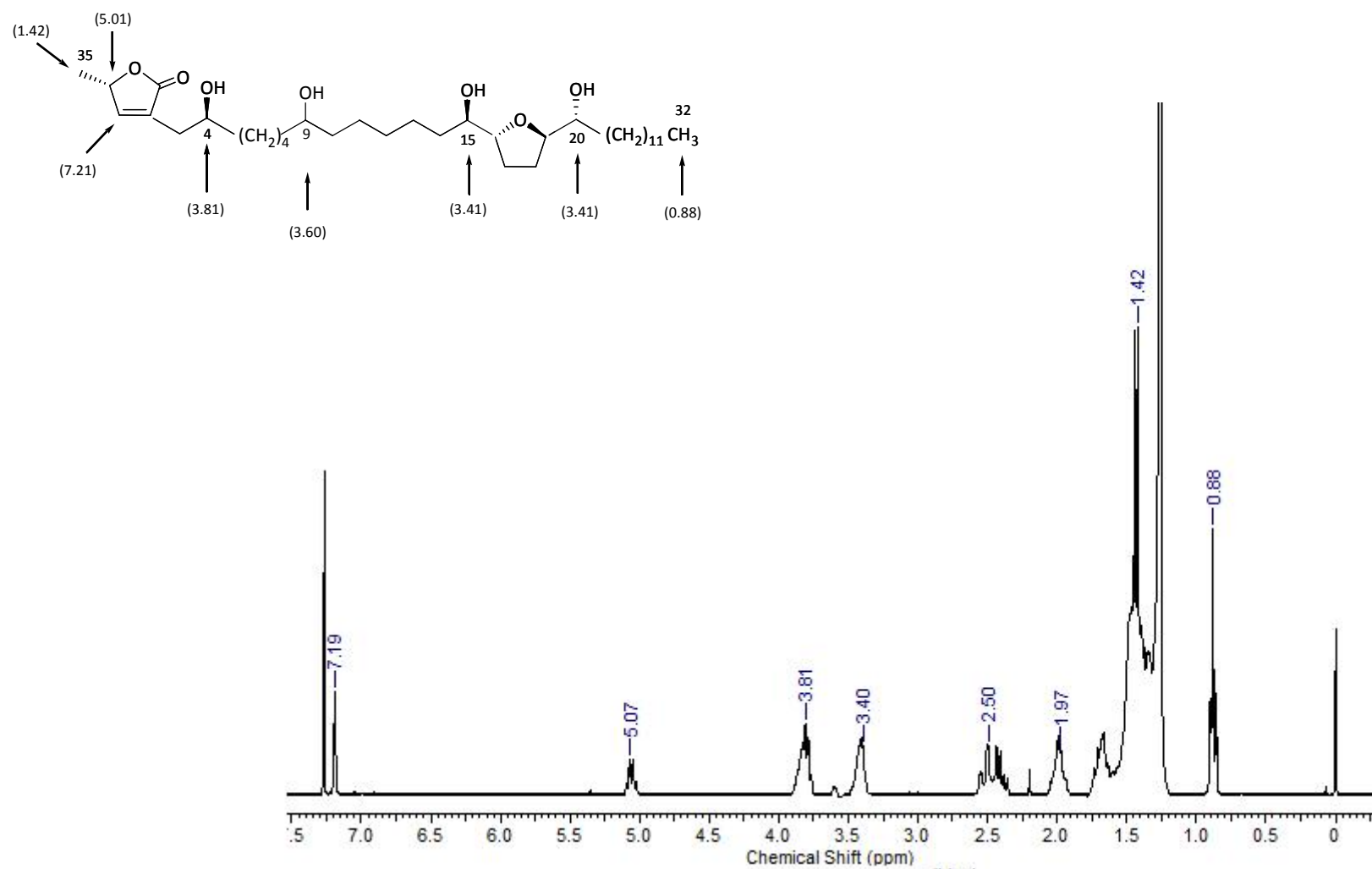
<sup>13</sup>C-RMN de **montalycin-C** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)



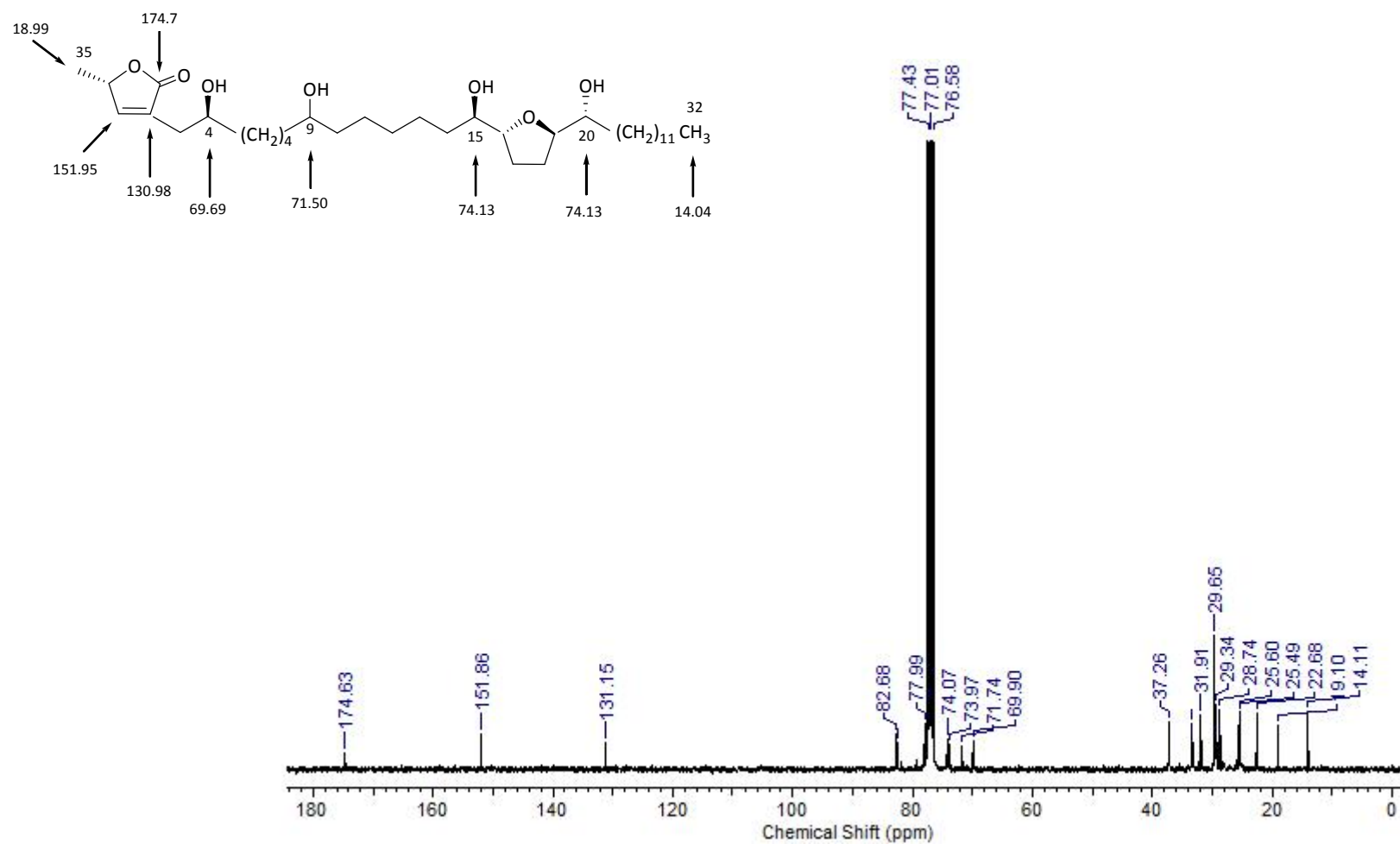
HSQC de **montalycin-C** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)



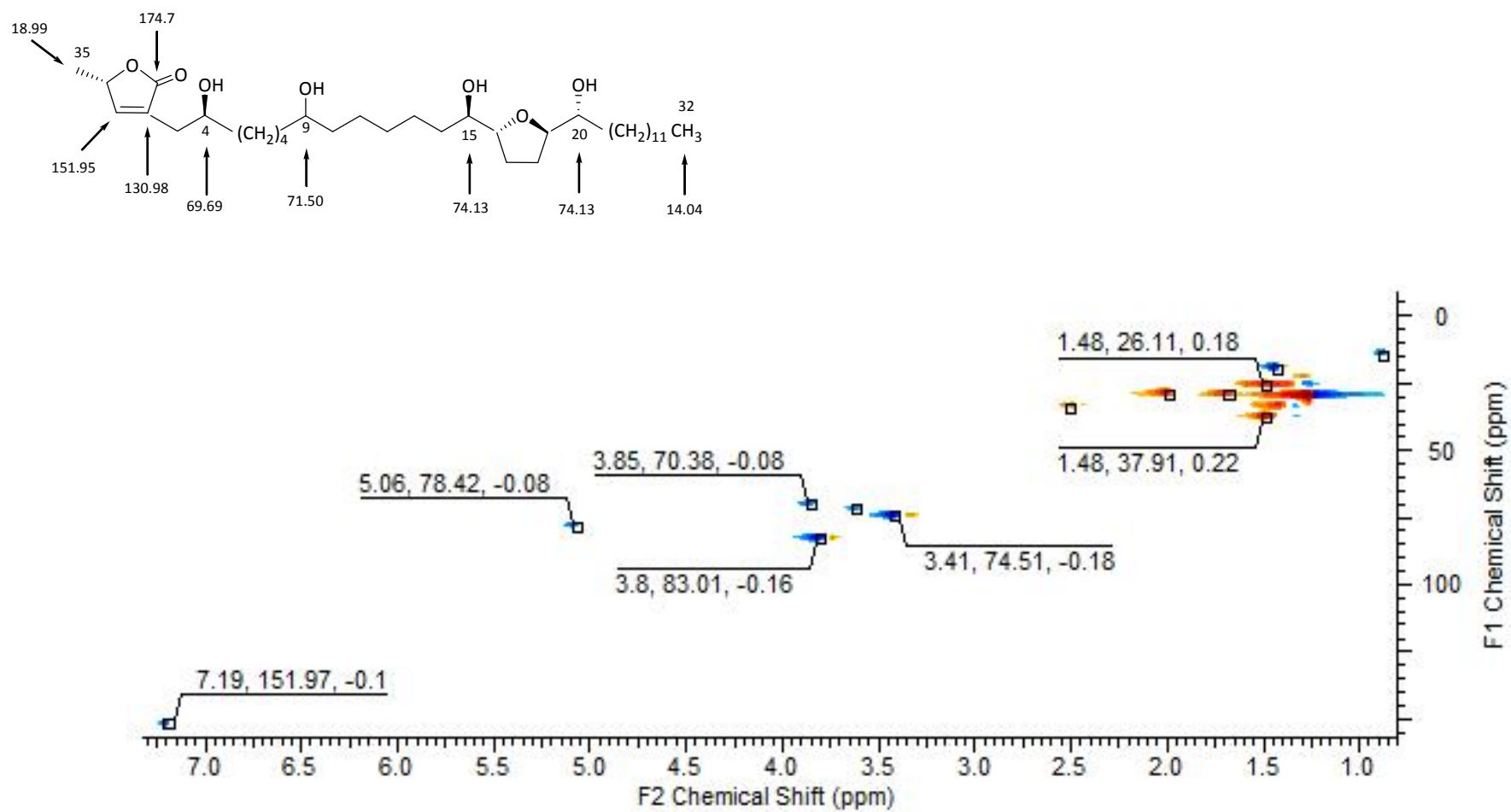
Fragmentación de **montalycin-C** (IE a 70 eV)



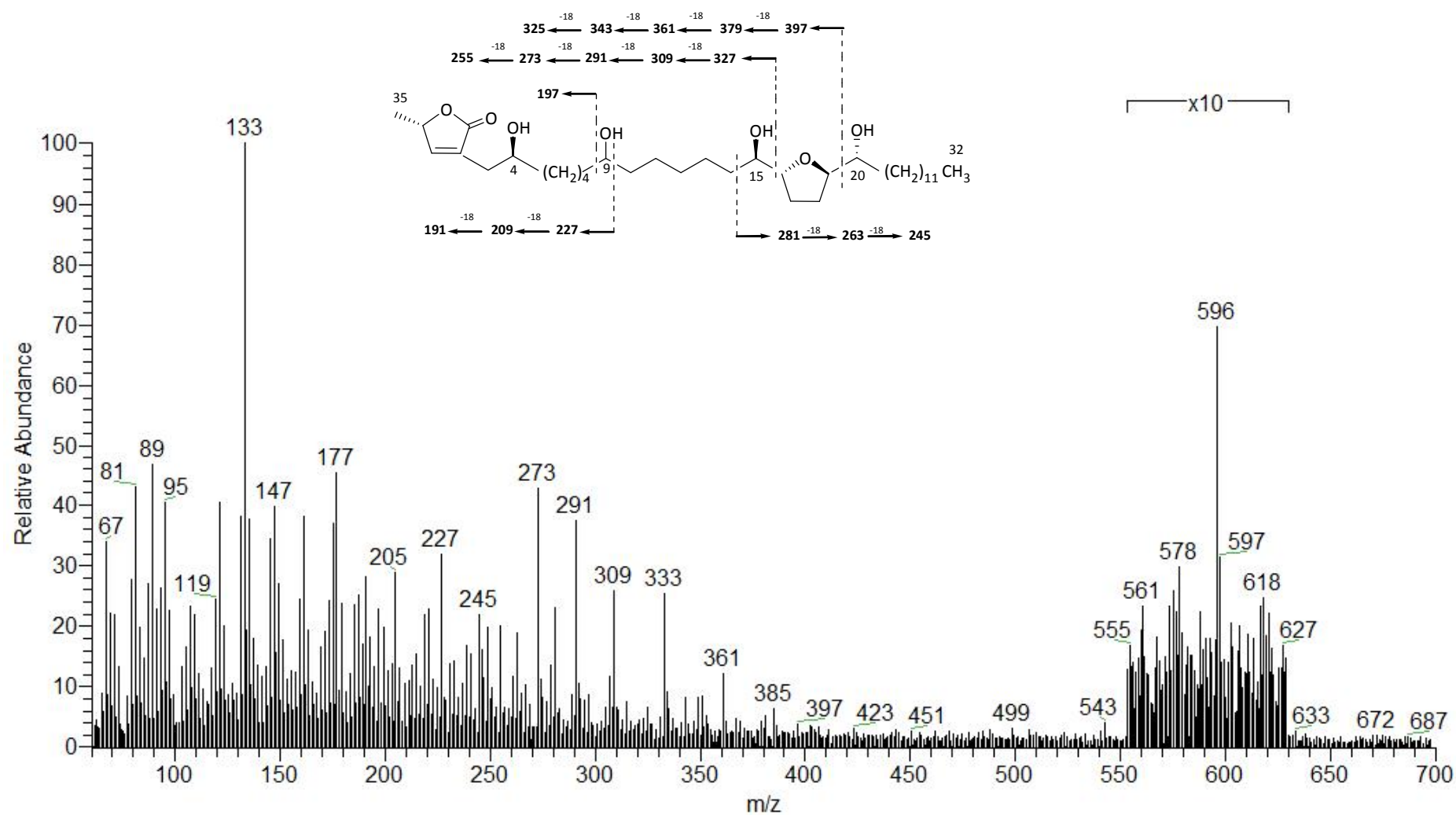
$^1\text{H}$ -RMN de **annoreticuin** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)



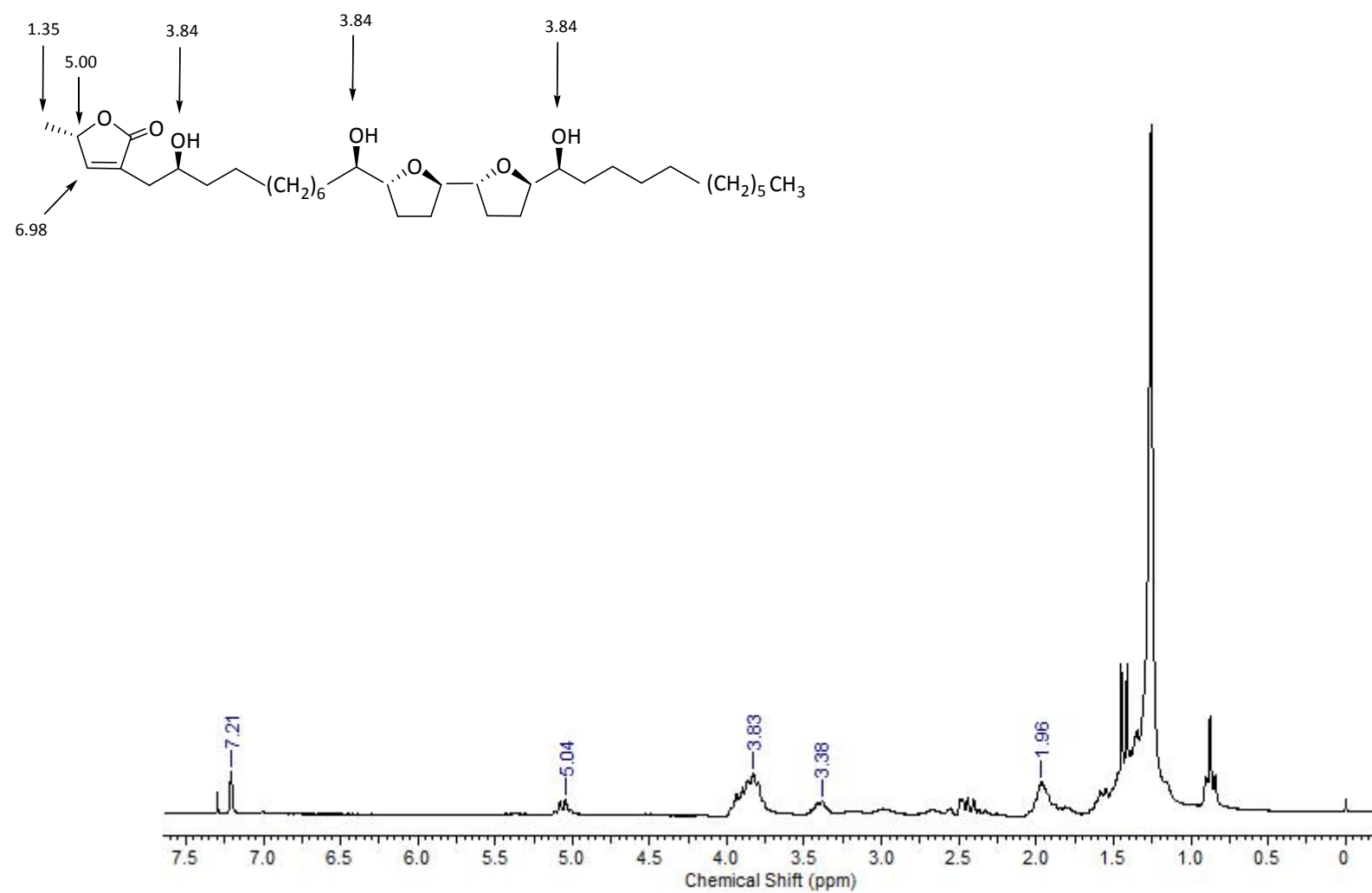
$^{13}\text{C}$ -RMN de **annoreticuin** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)



HSQC de **annoreticuine** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

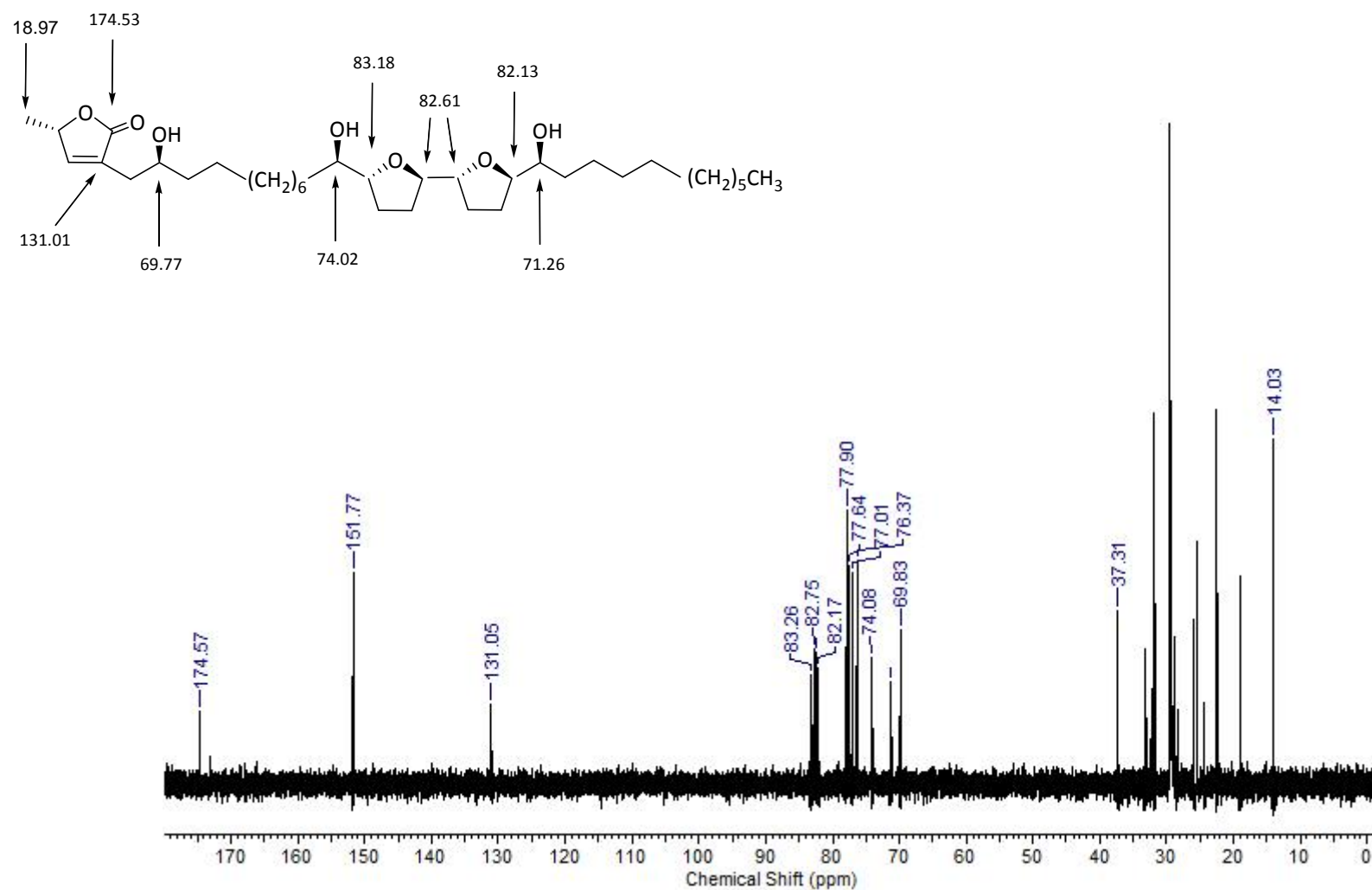


Fragmentación de **annorecticin** (IE a 70 eV)

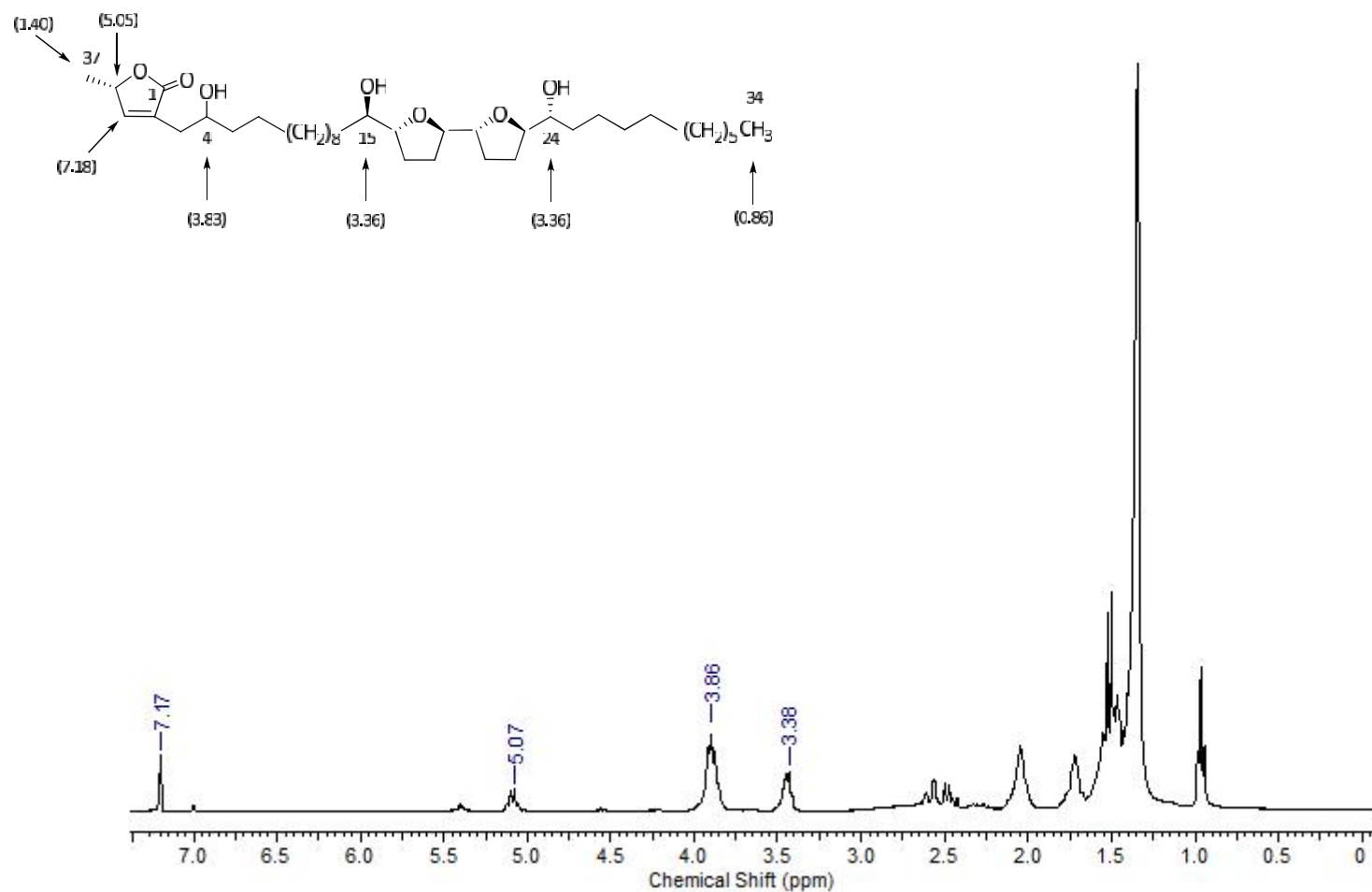


$^1\text{H}$ -RMN de **molvizarin** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

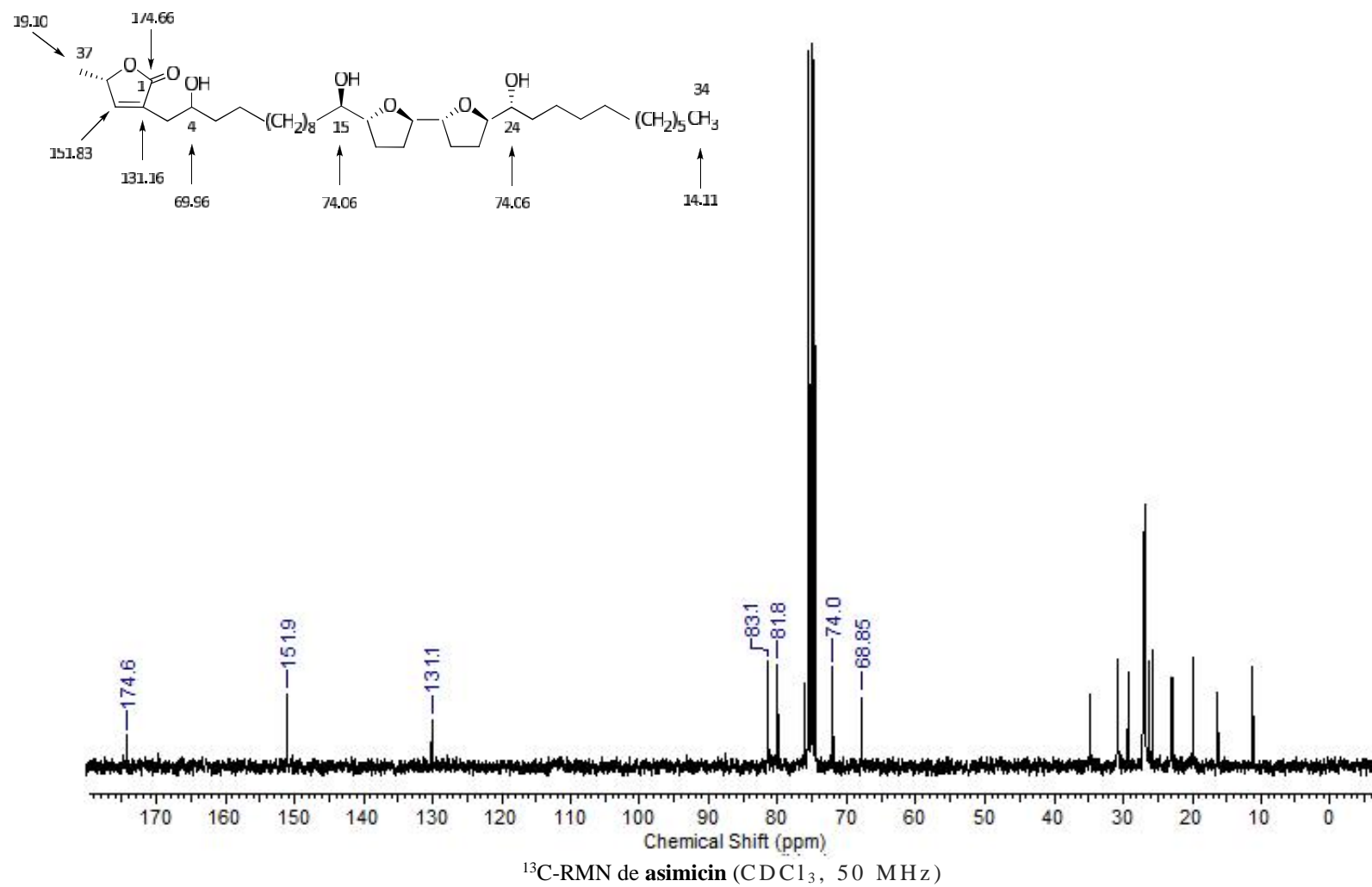


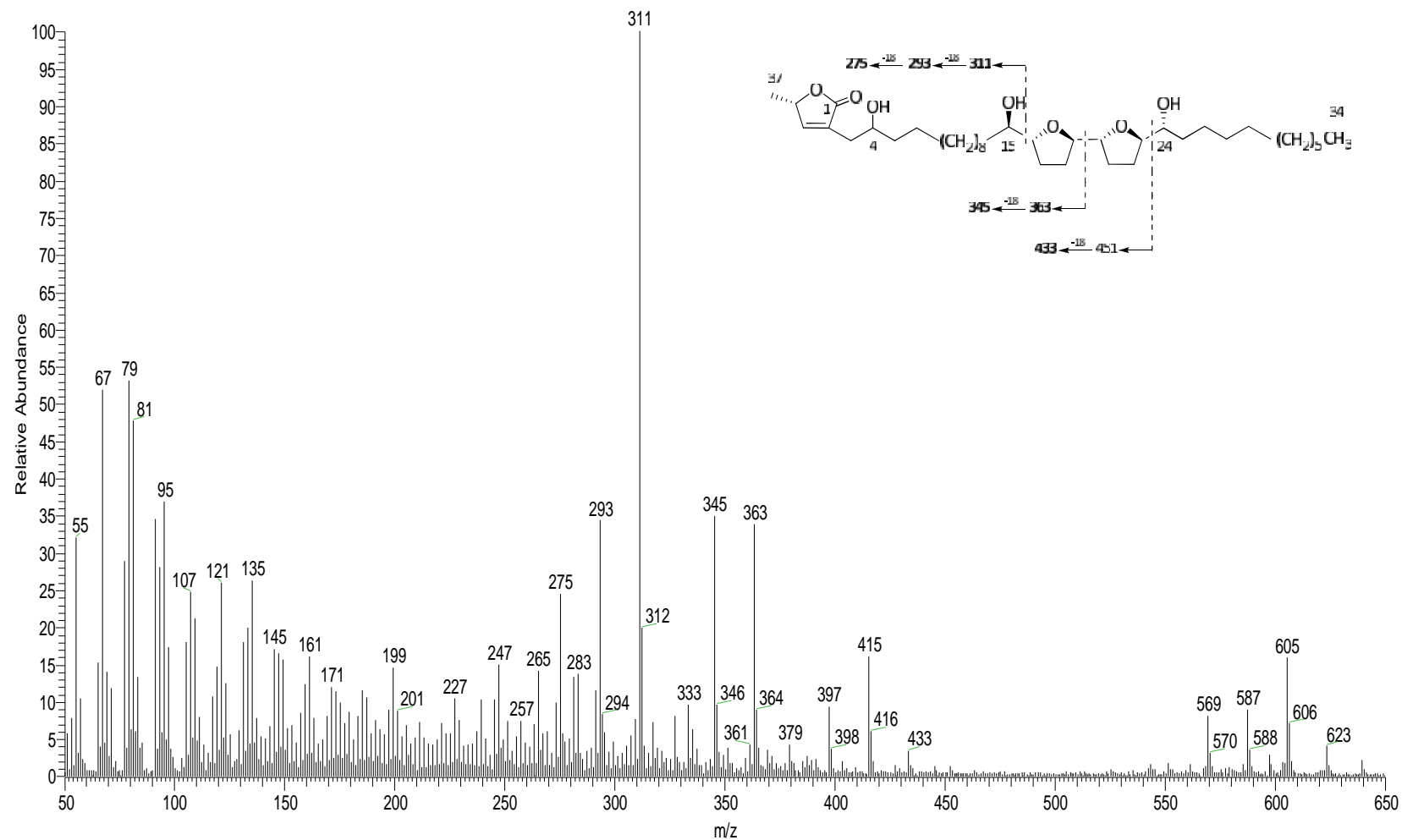


$^{13}\text{C}$ -RMN de **molvizarin** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

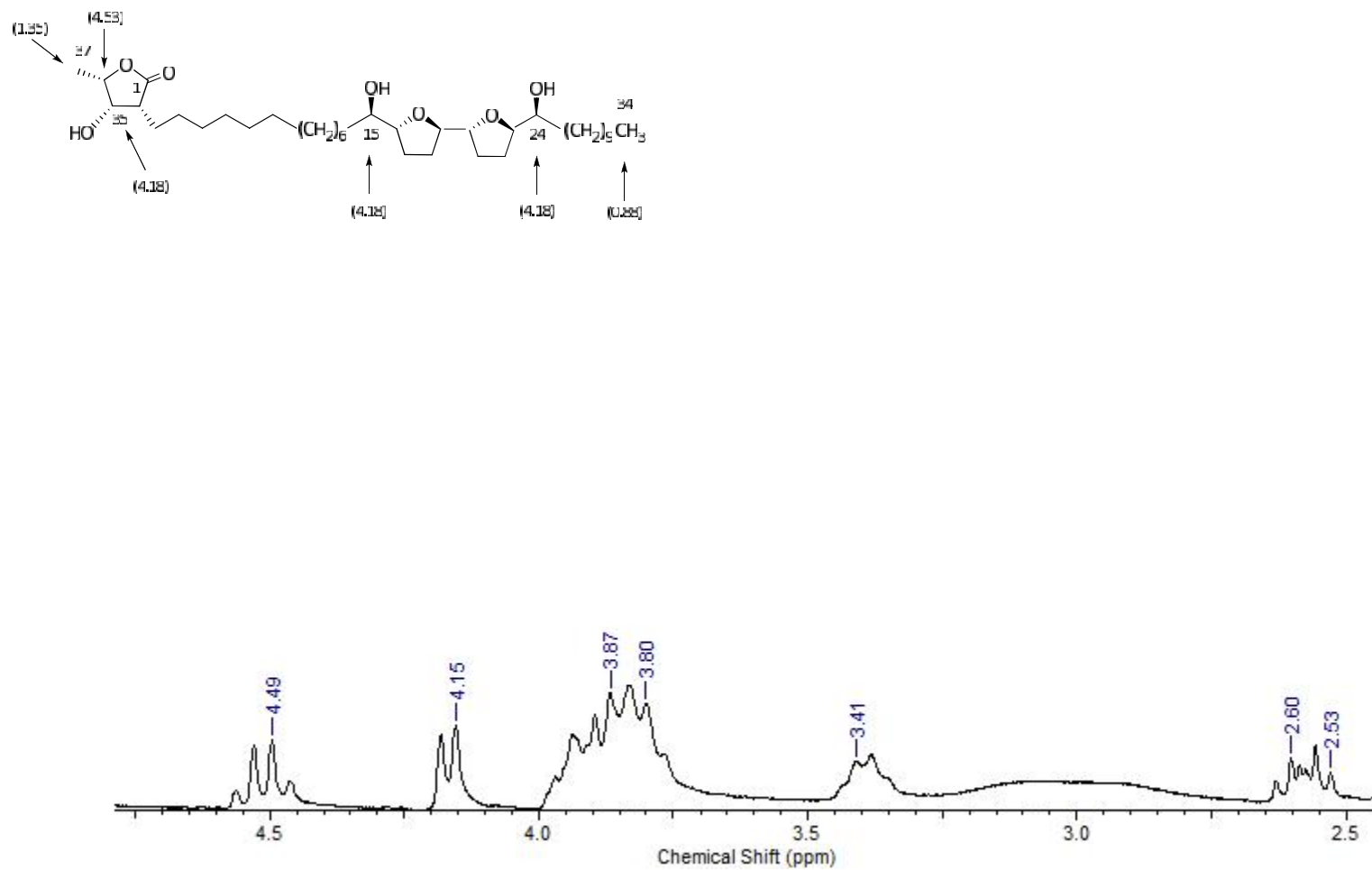


$^1\text{H}$ -RMN de **asimicin** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

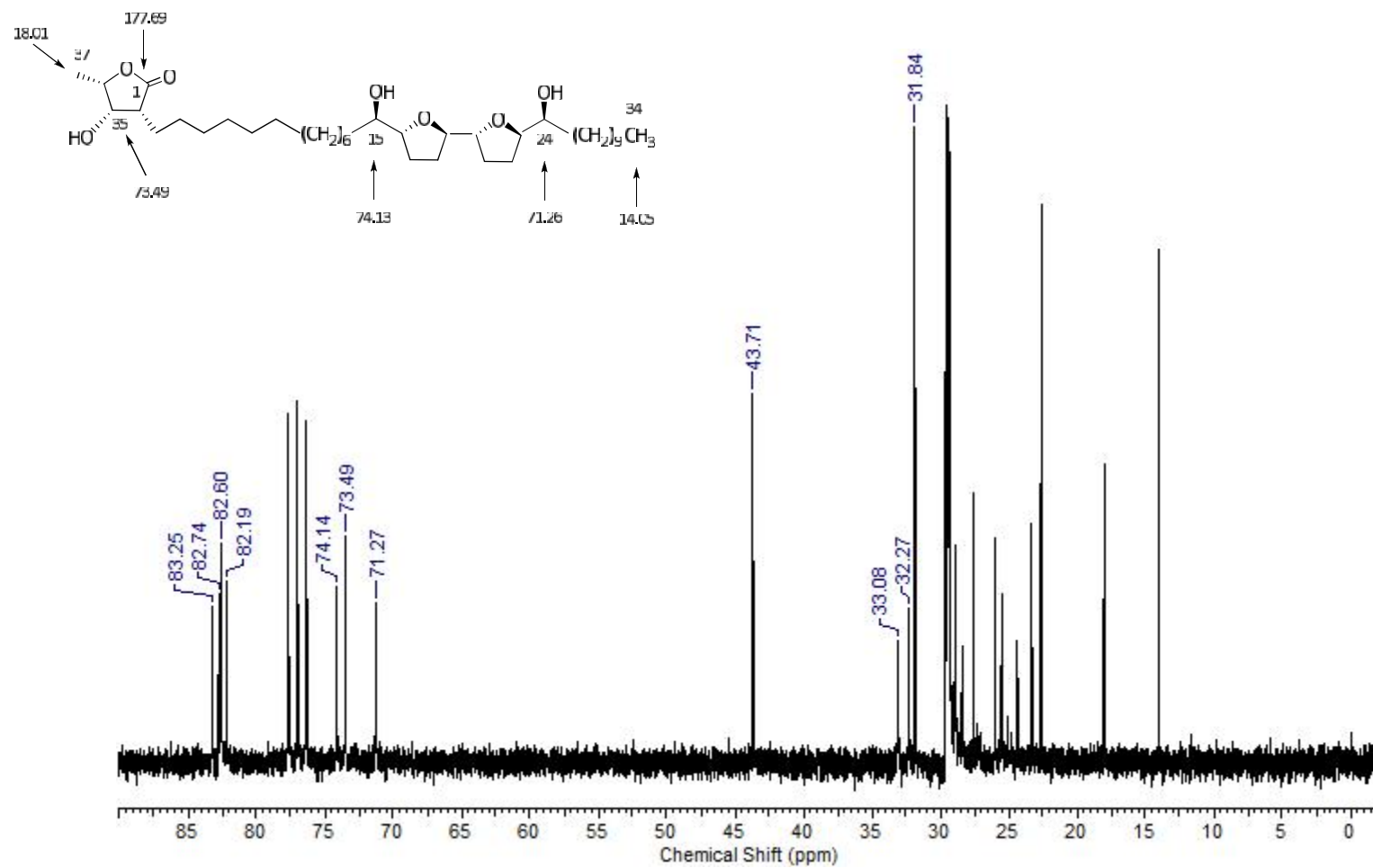




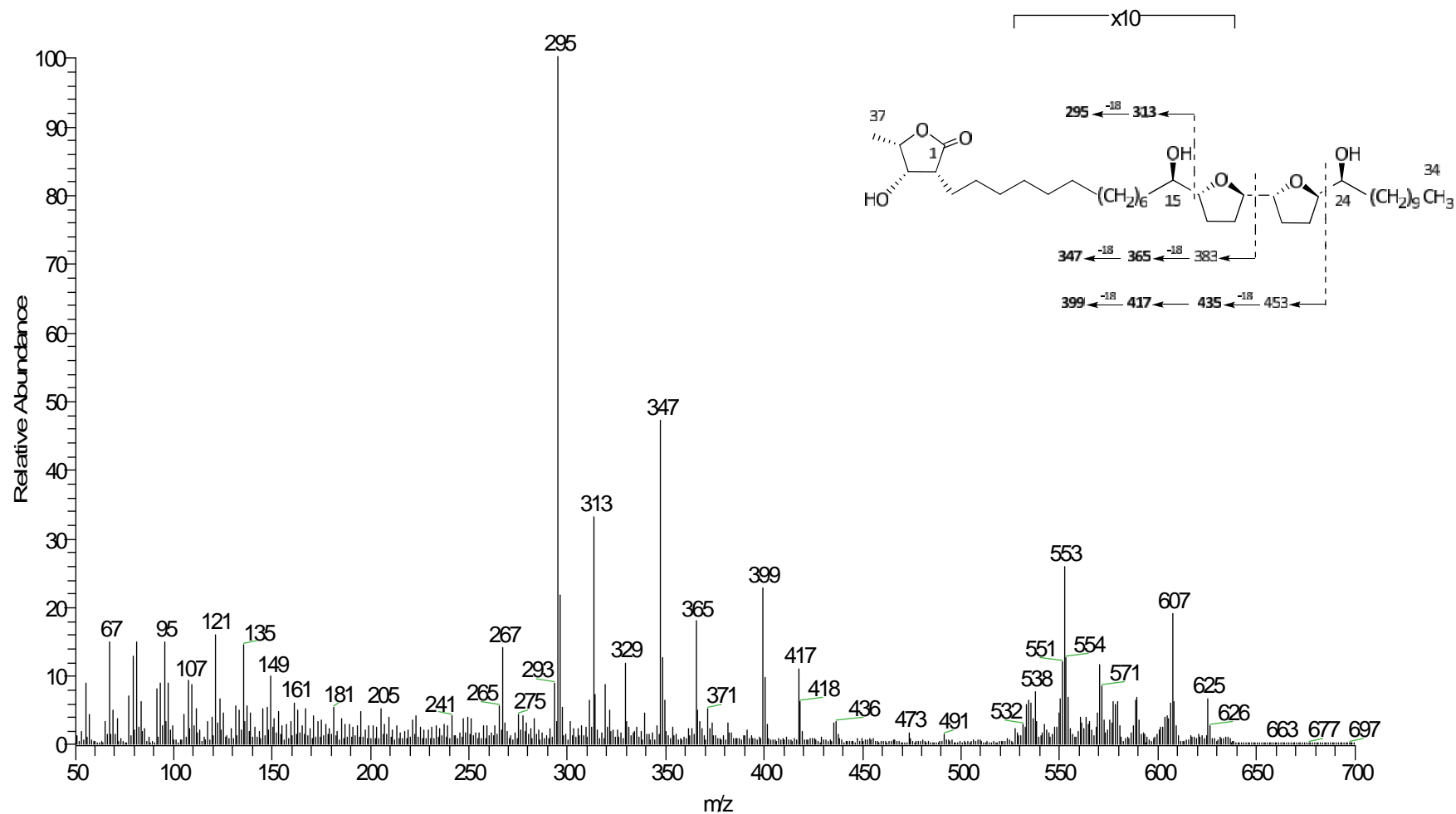
Fragmentación de masas de **asimicin** (IE, 70 eV)



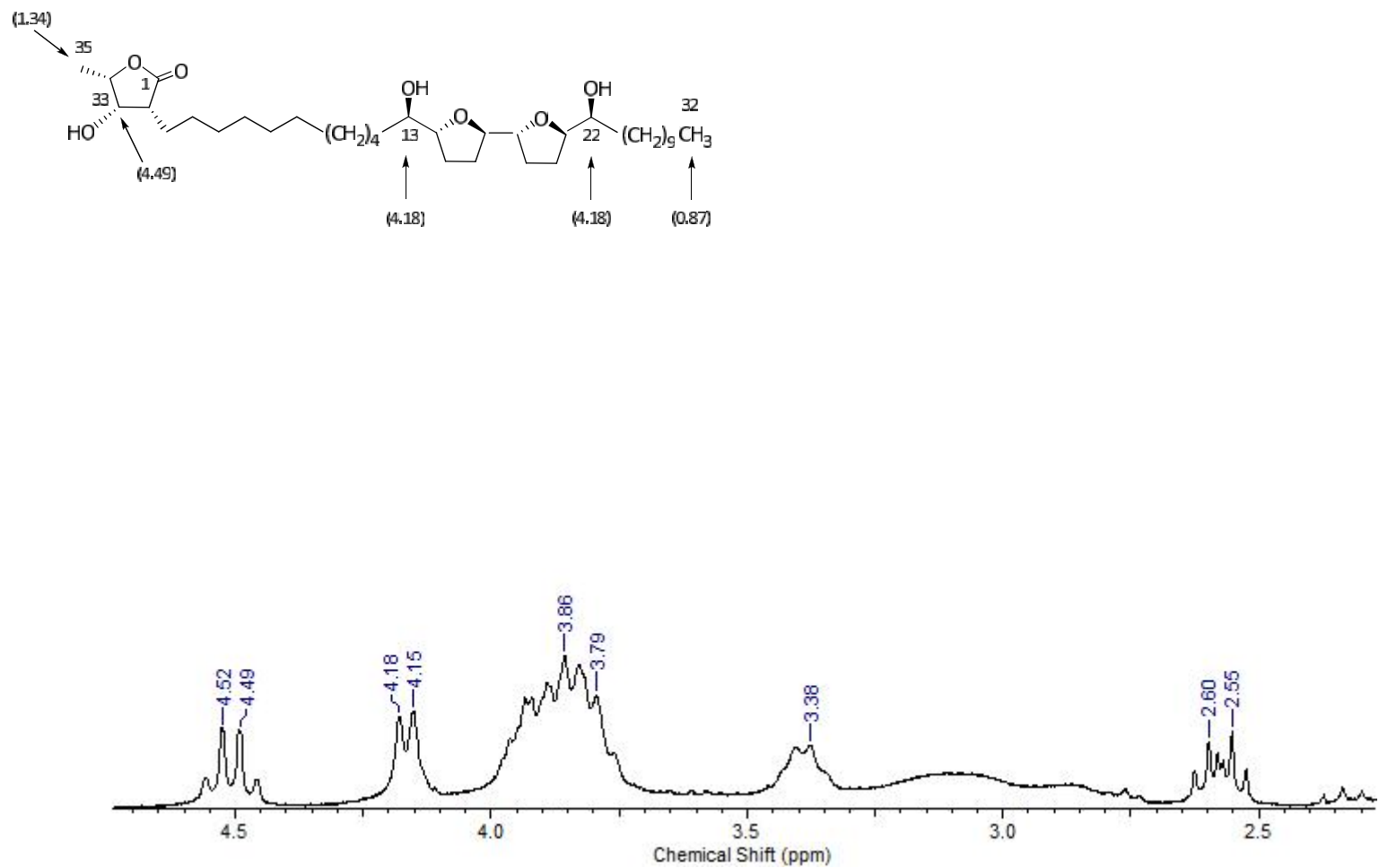
<sup>1</sup>H-RMN de laherradurin (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



$^{13}\text{C}$ -RMN de laherradurin ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

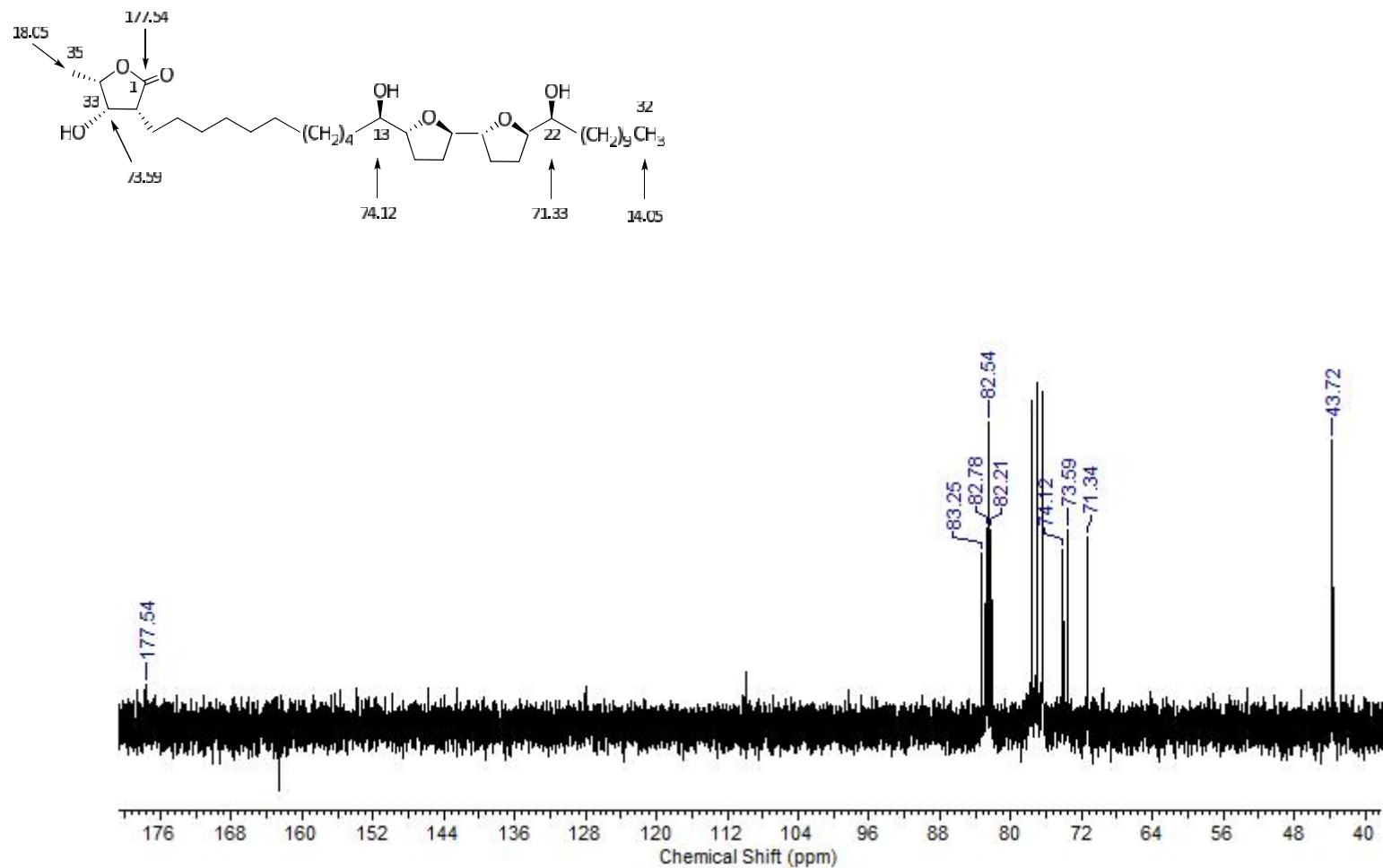


Fragmentación de **laherradurin** (IE a 70 eV)

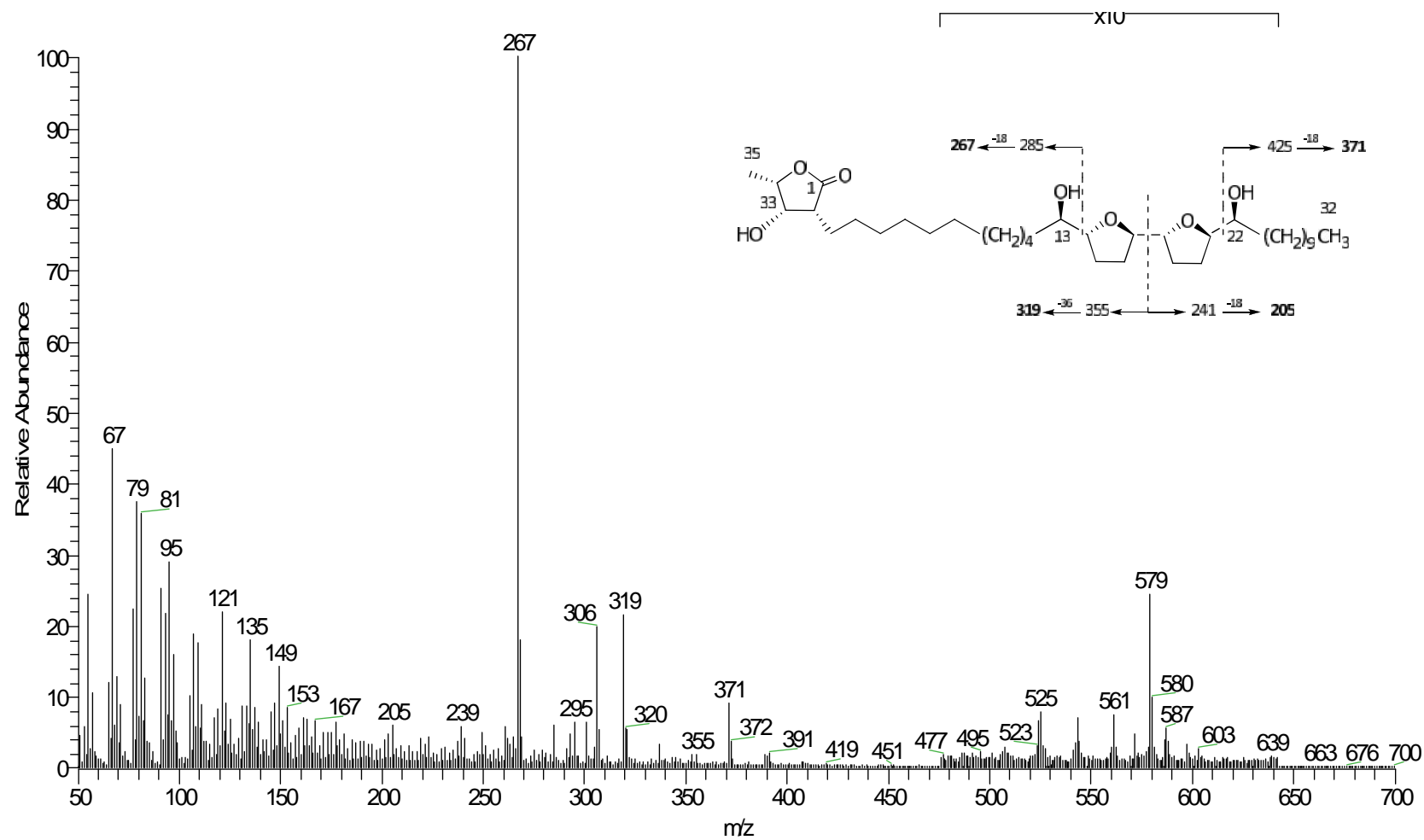


<sup>1</sup>H-RMN de **itraconazole** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

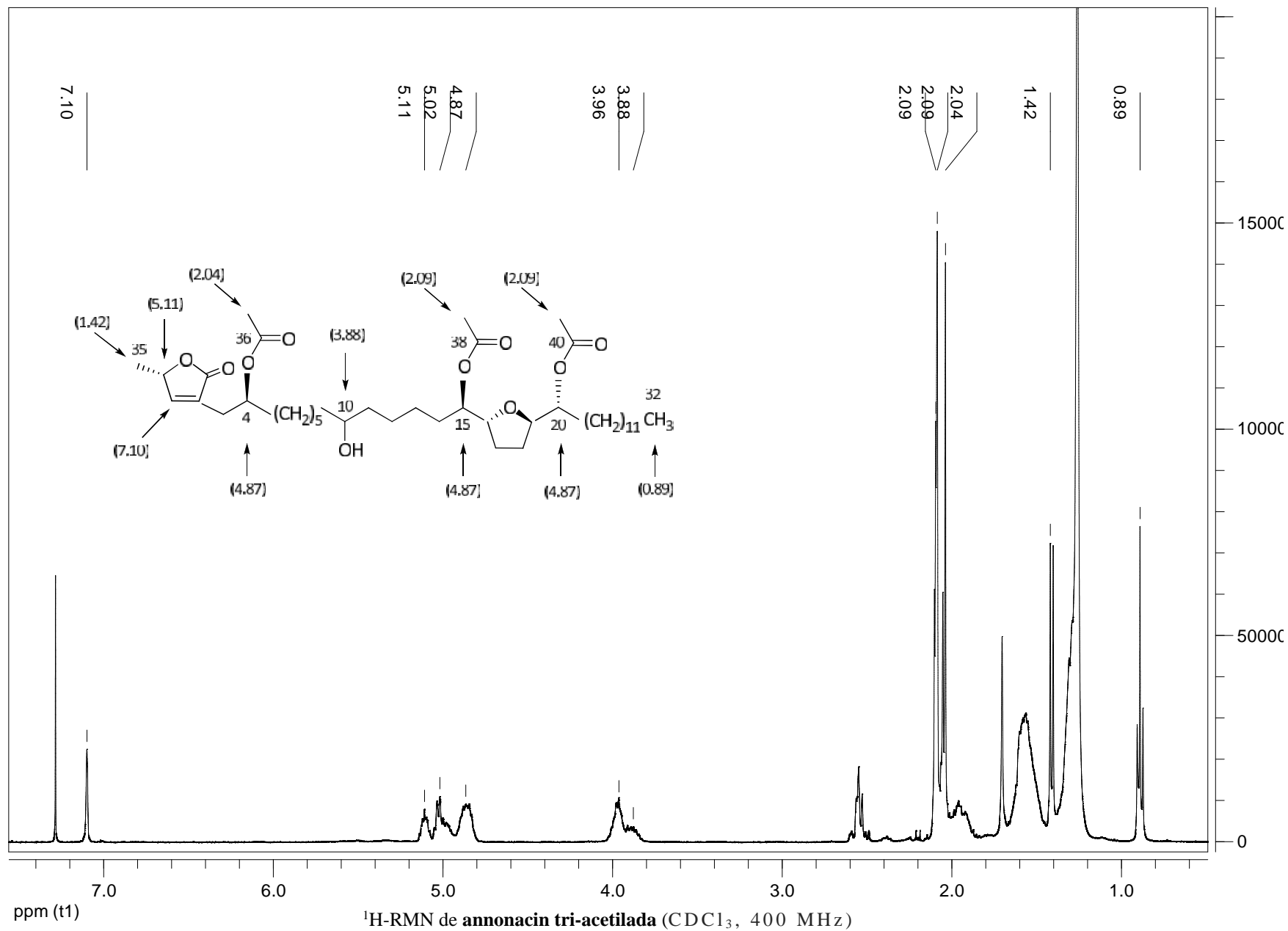


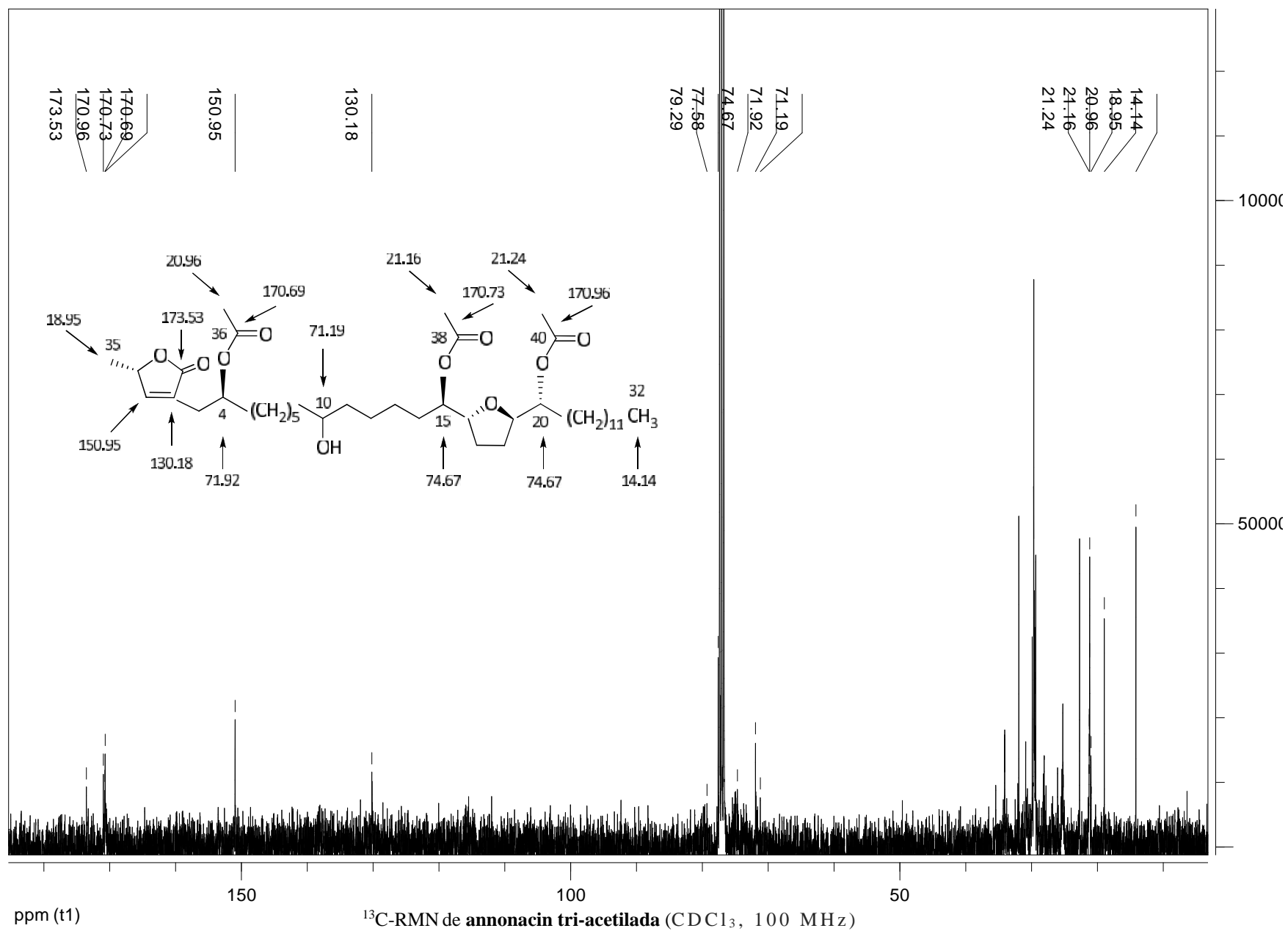


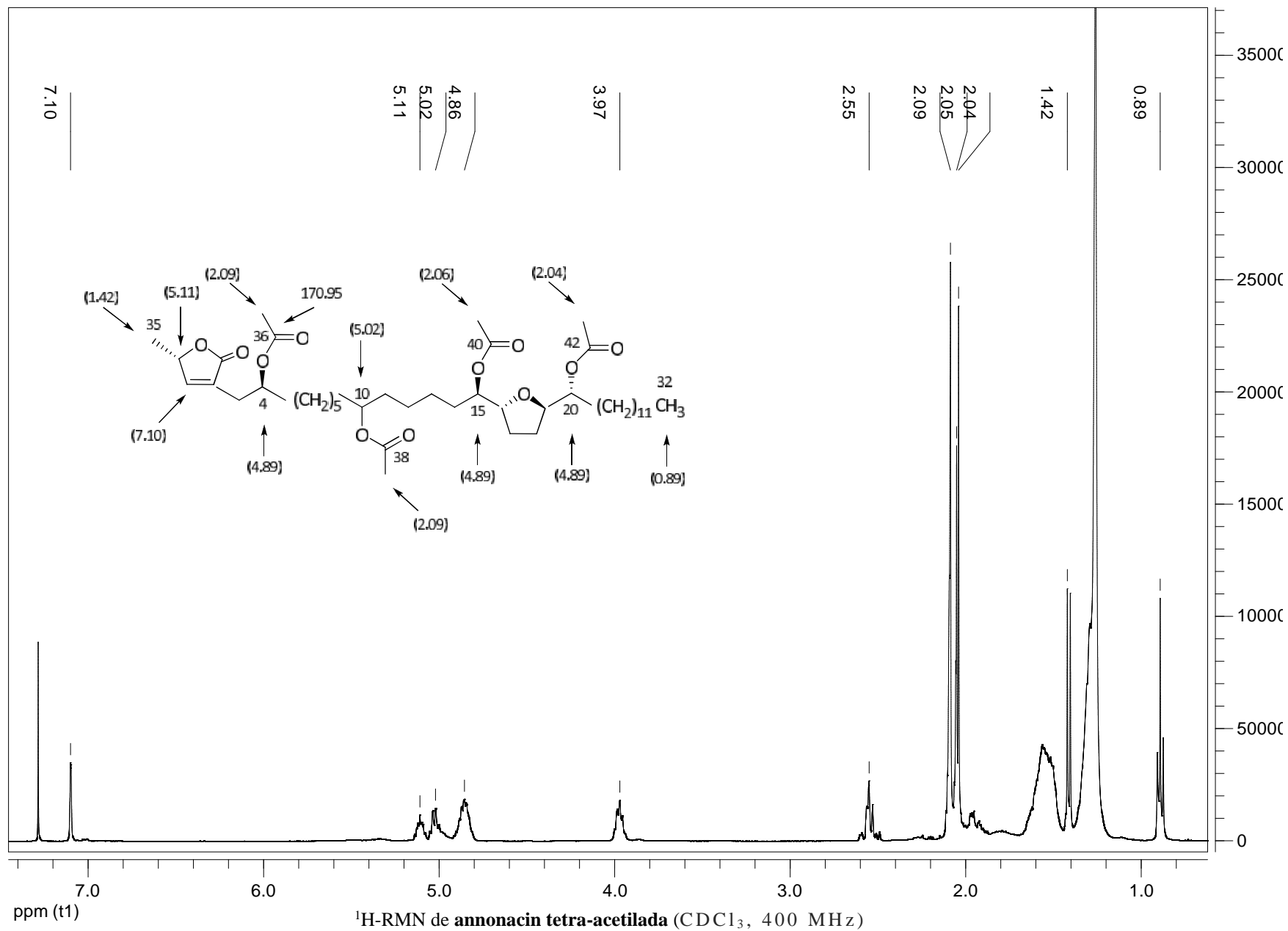
$^{13}\text{C}$ -RMN de **itrabin** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

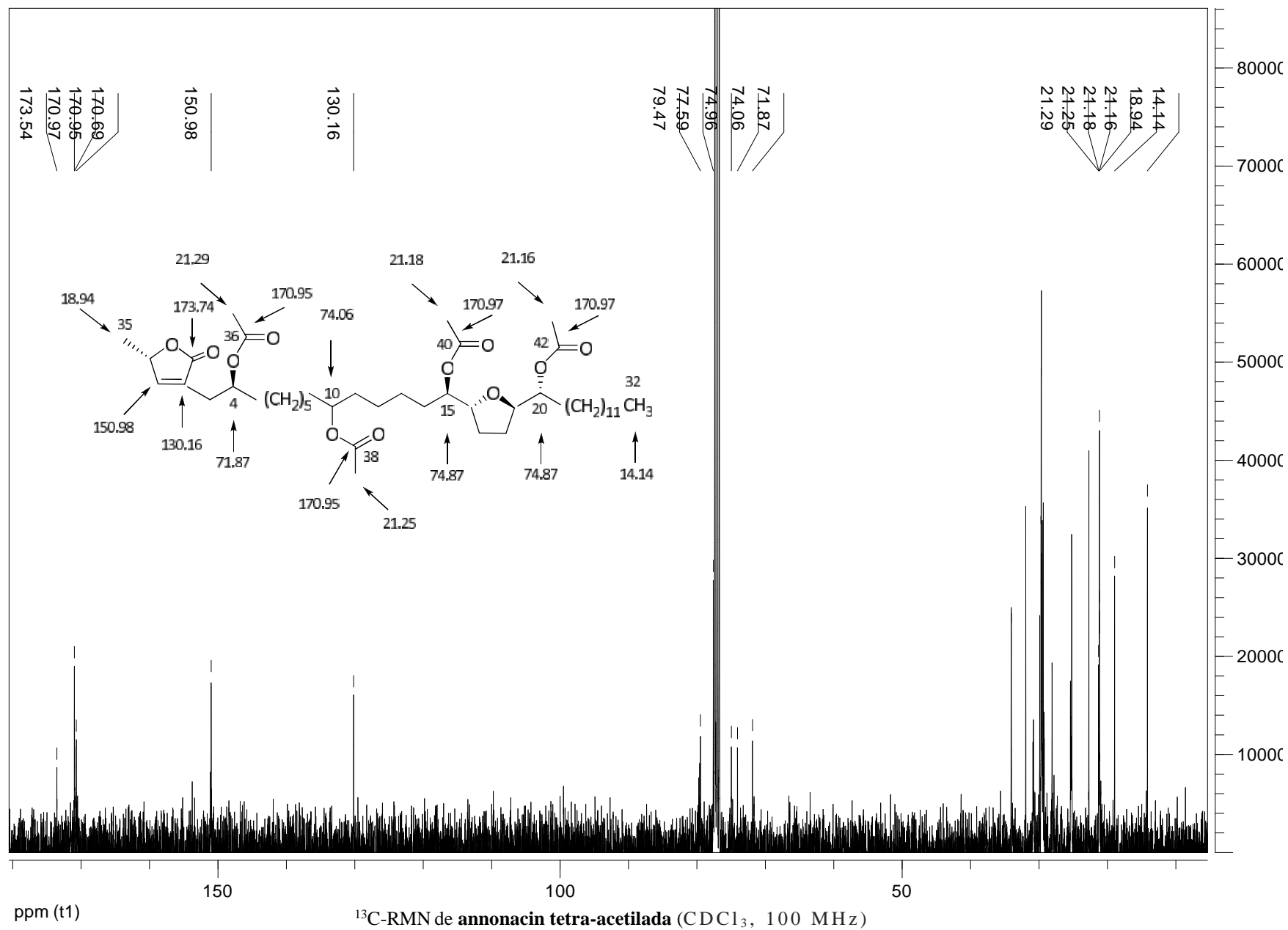


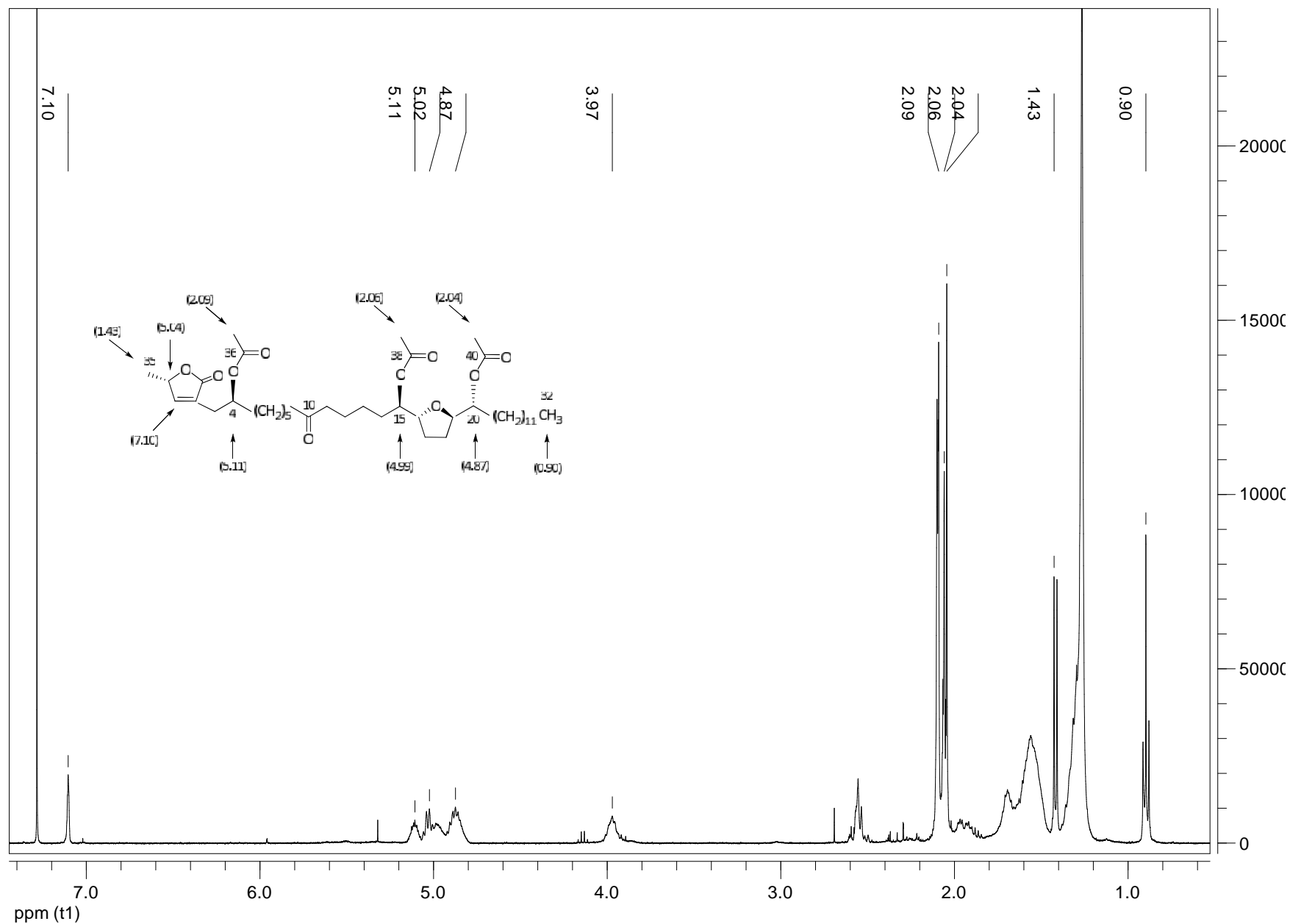
Fragmentación de **itrafin** (IE a 70 eV)



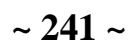




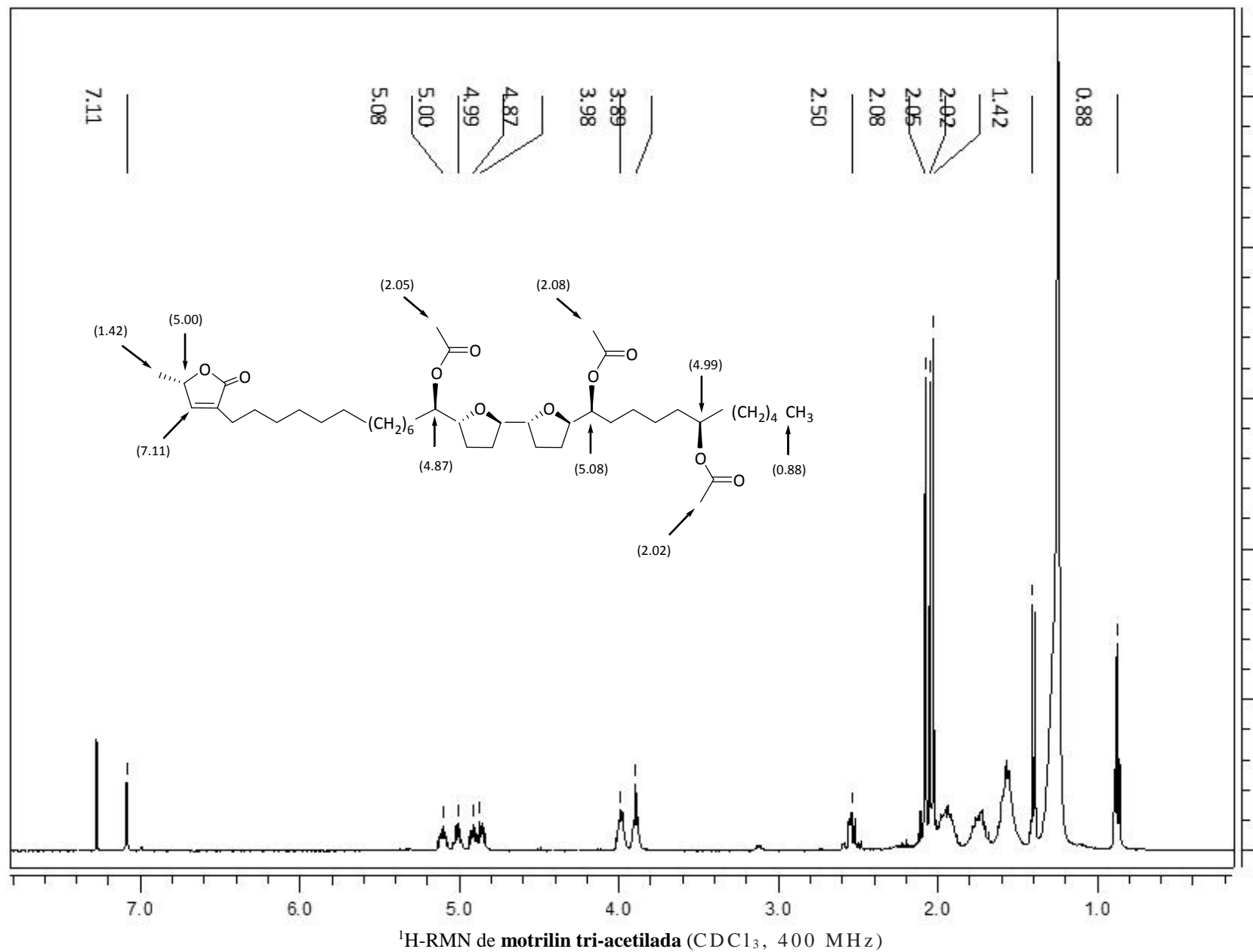




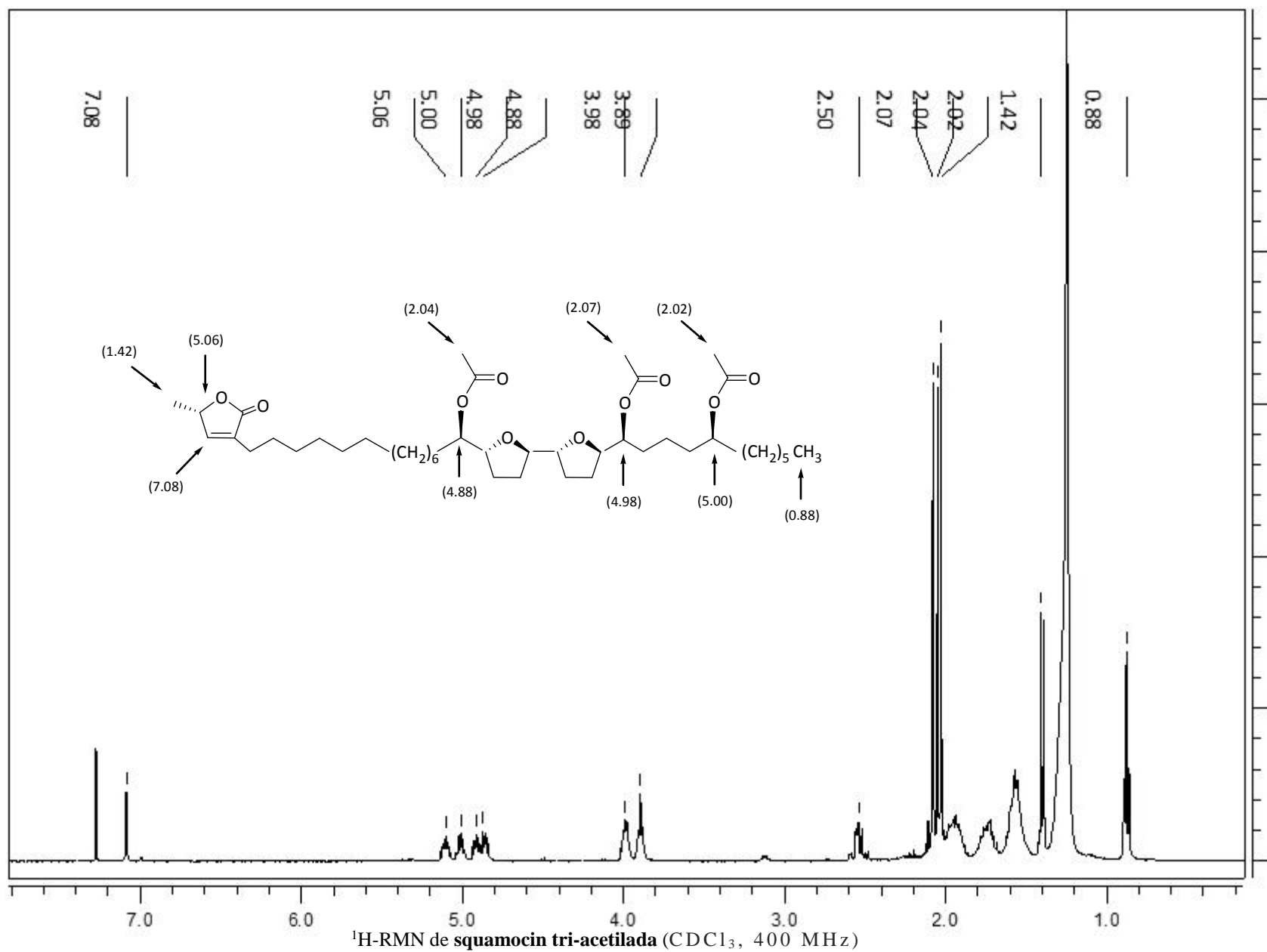
$^1\text{H}$ -RMN de *cis*-annonacin-10-one tri-acetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

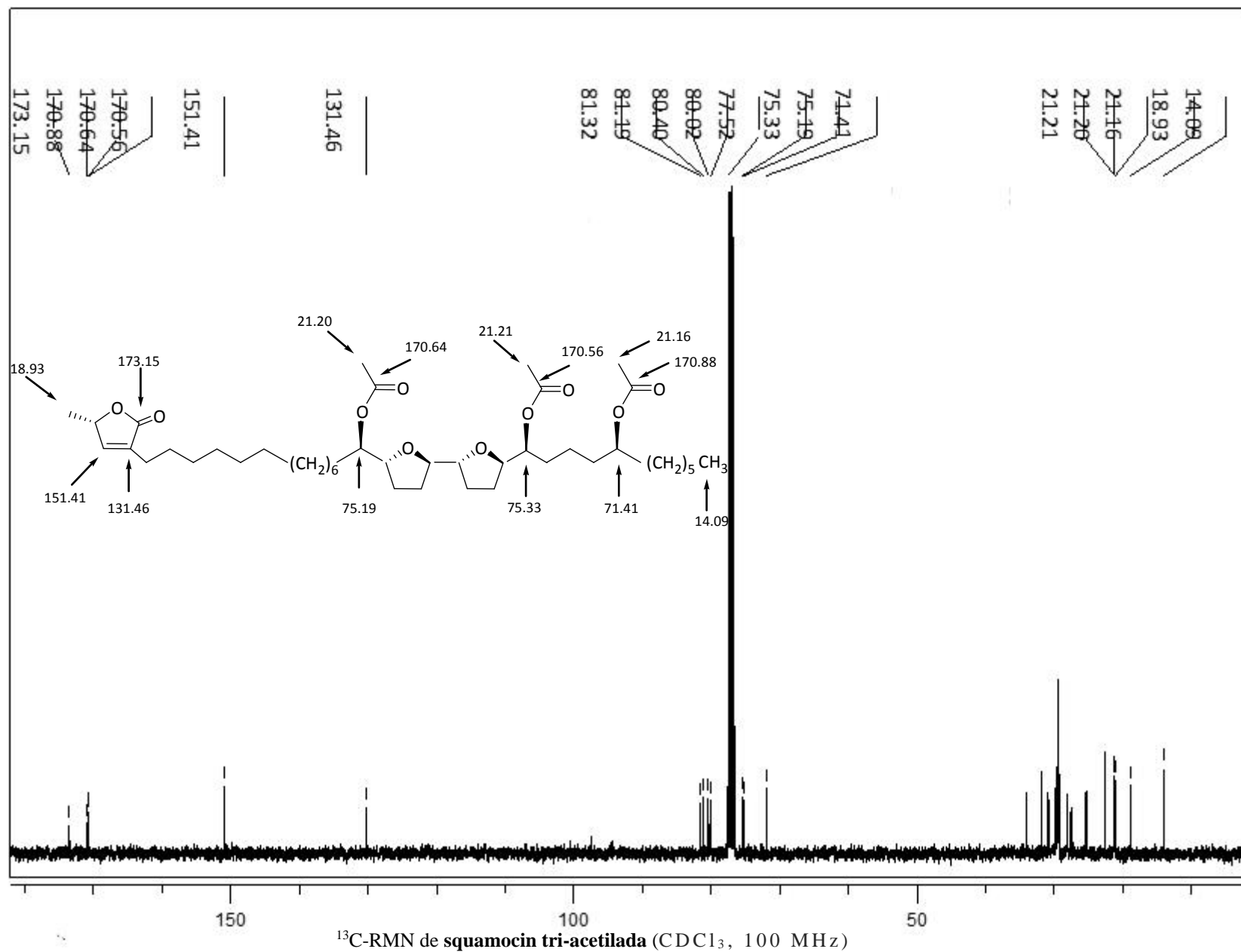


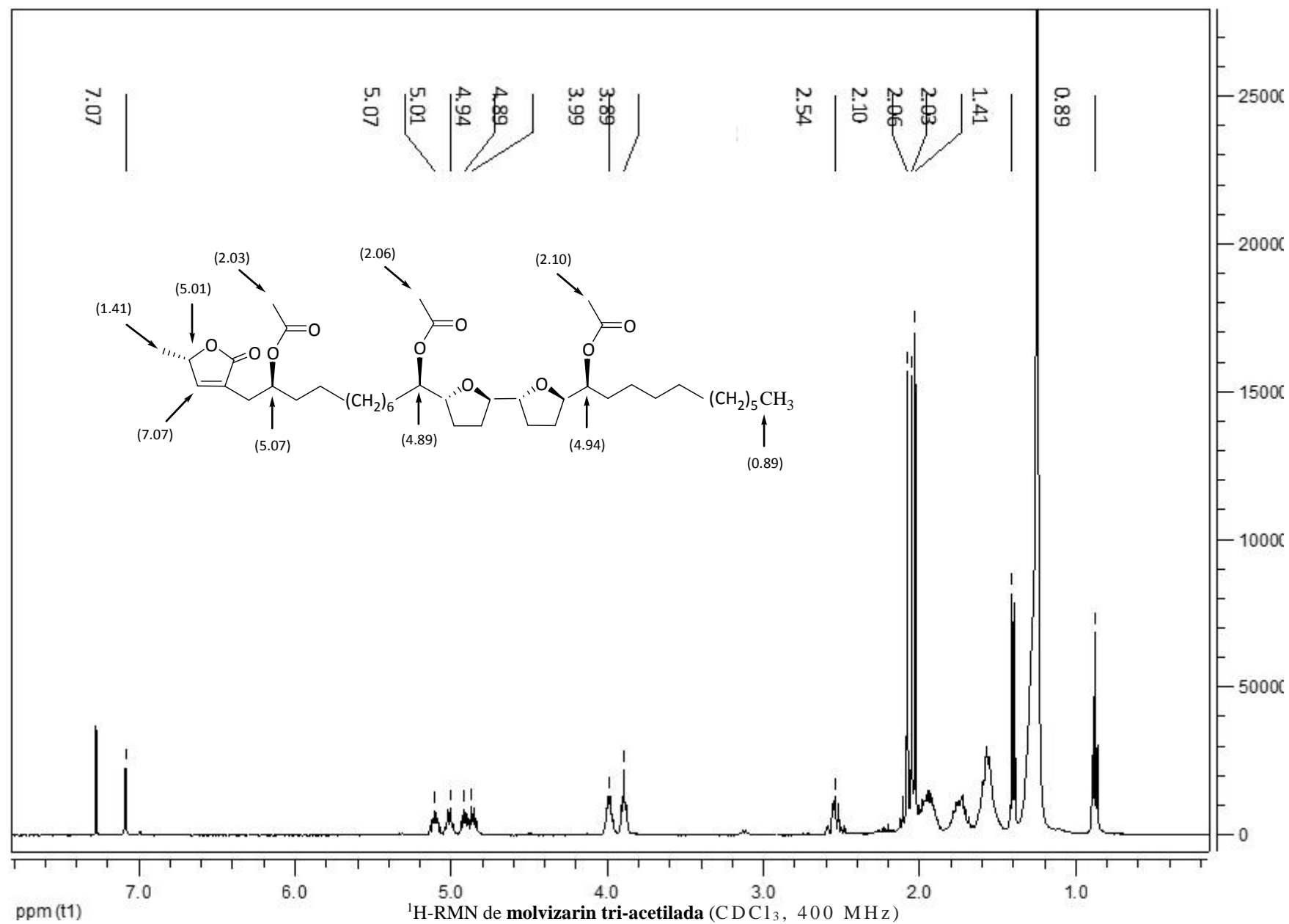




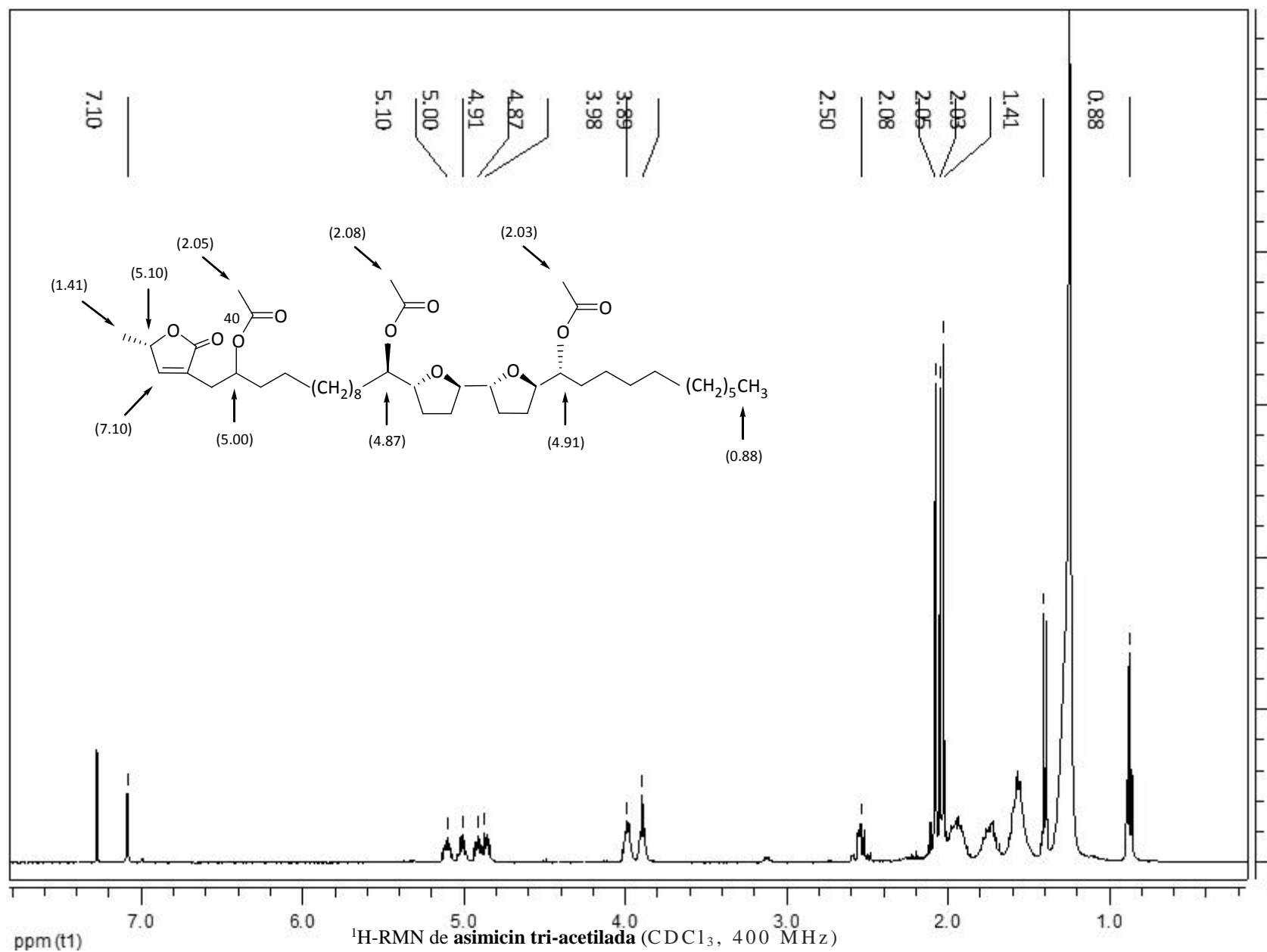


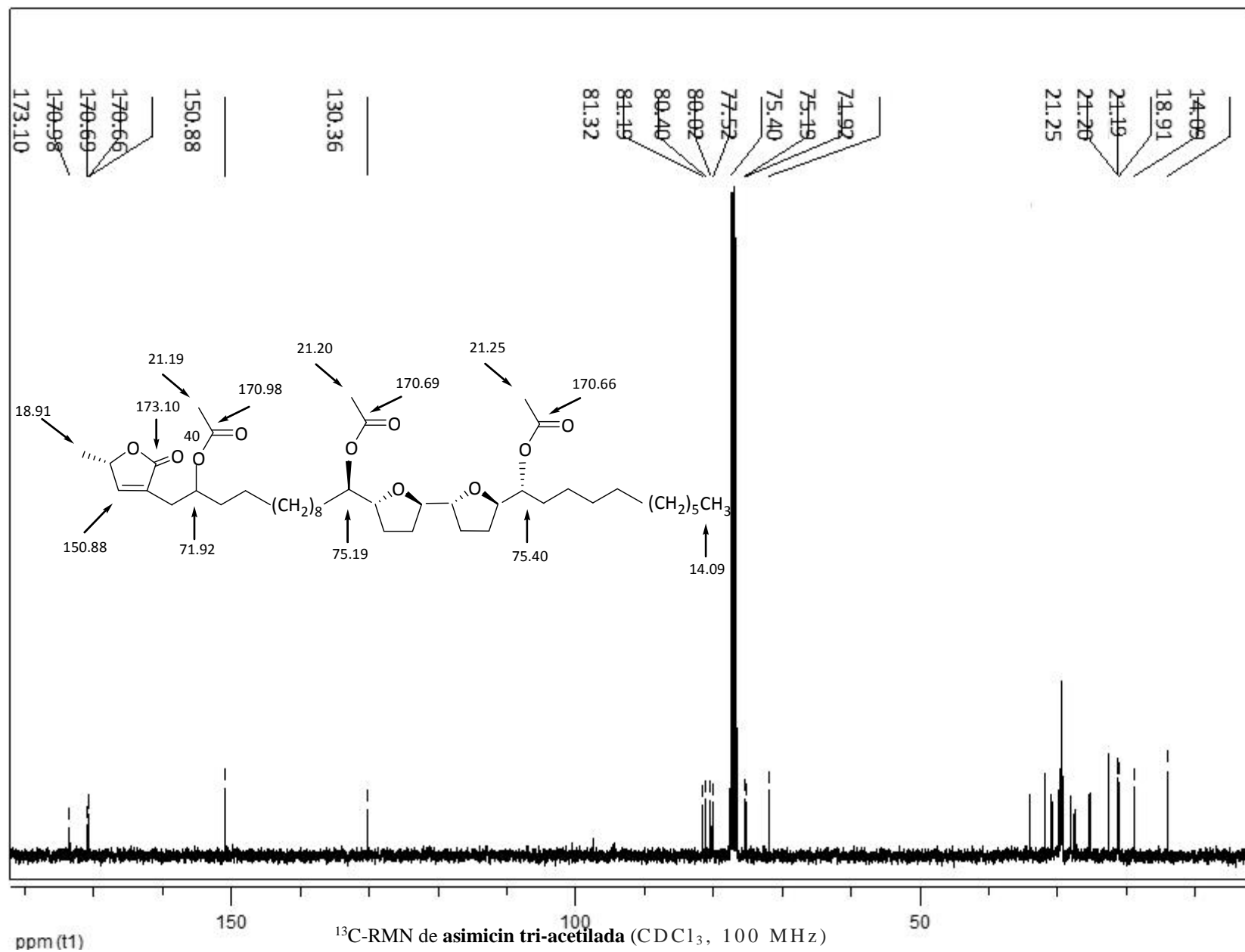




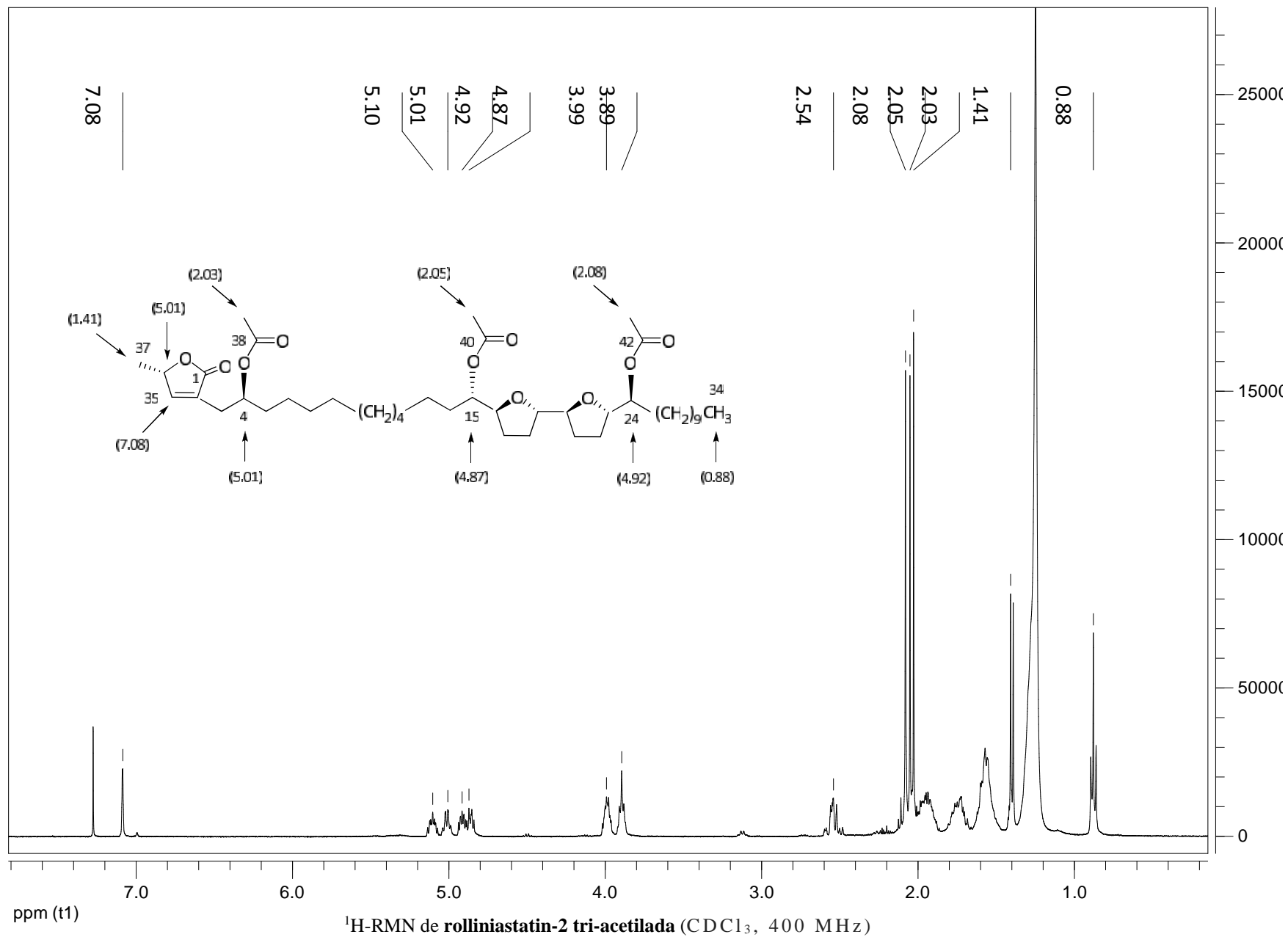


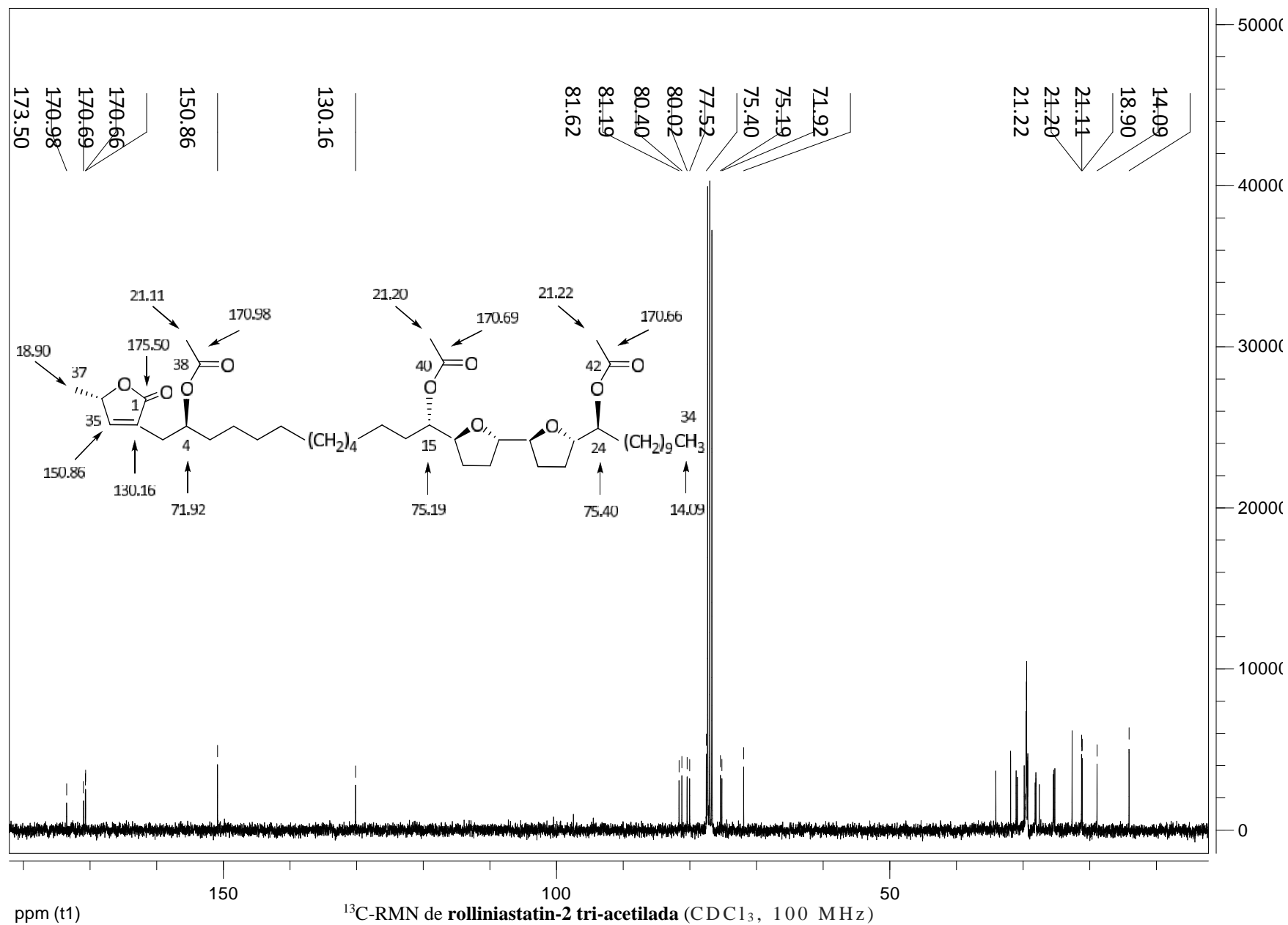


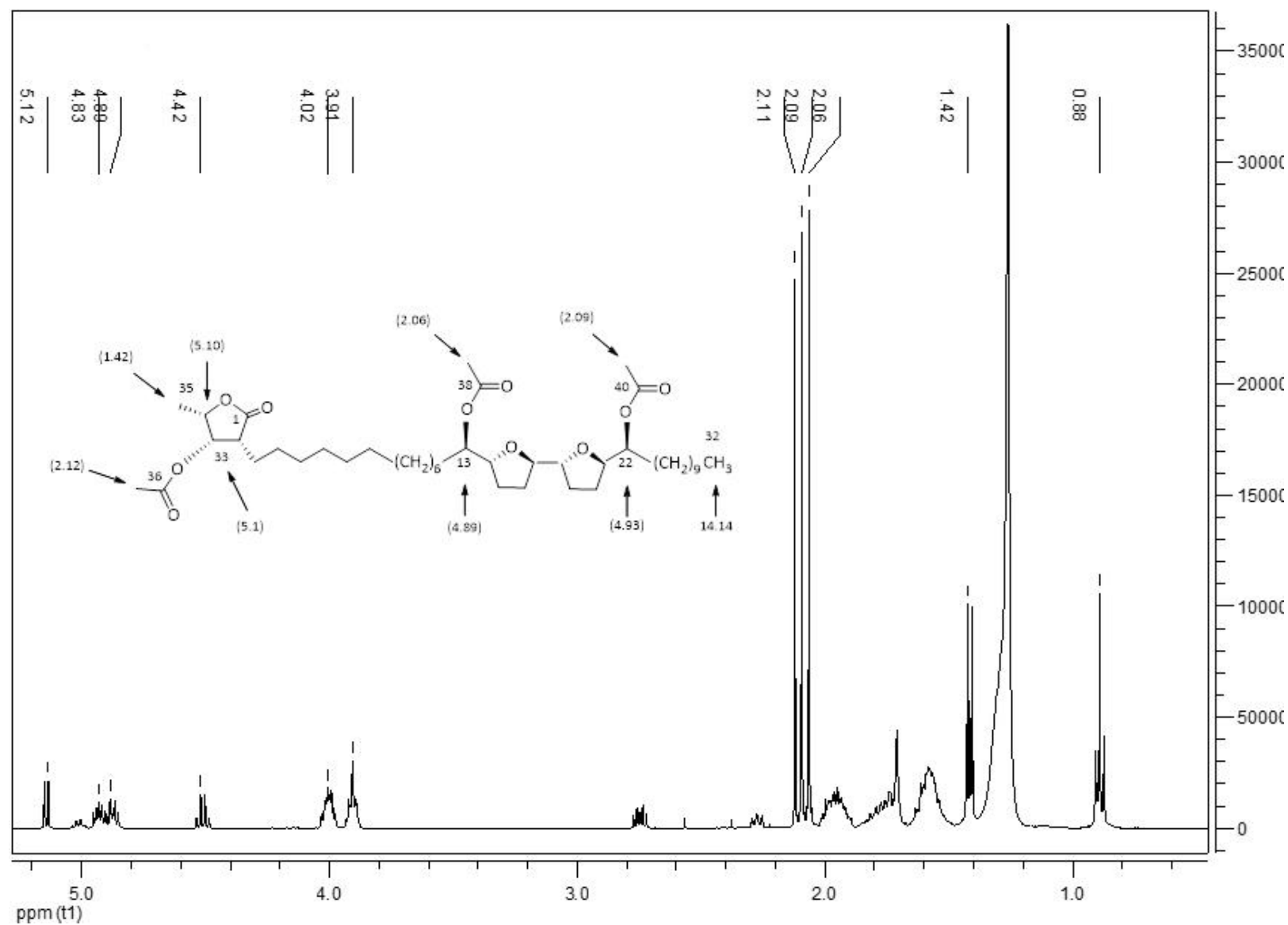




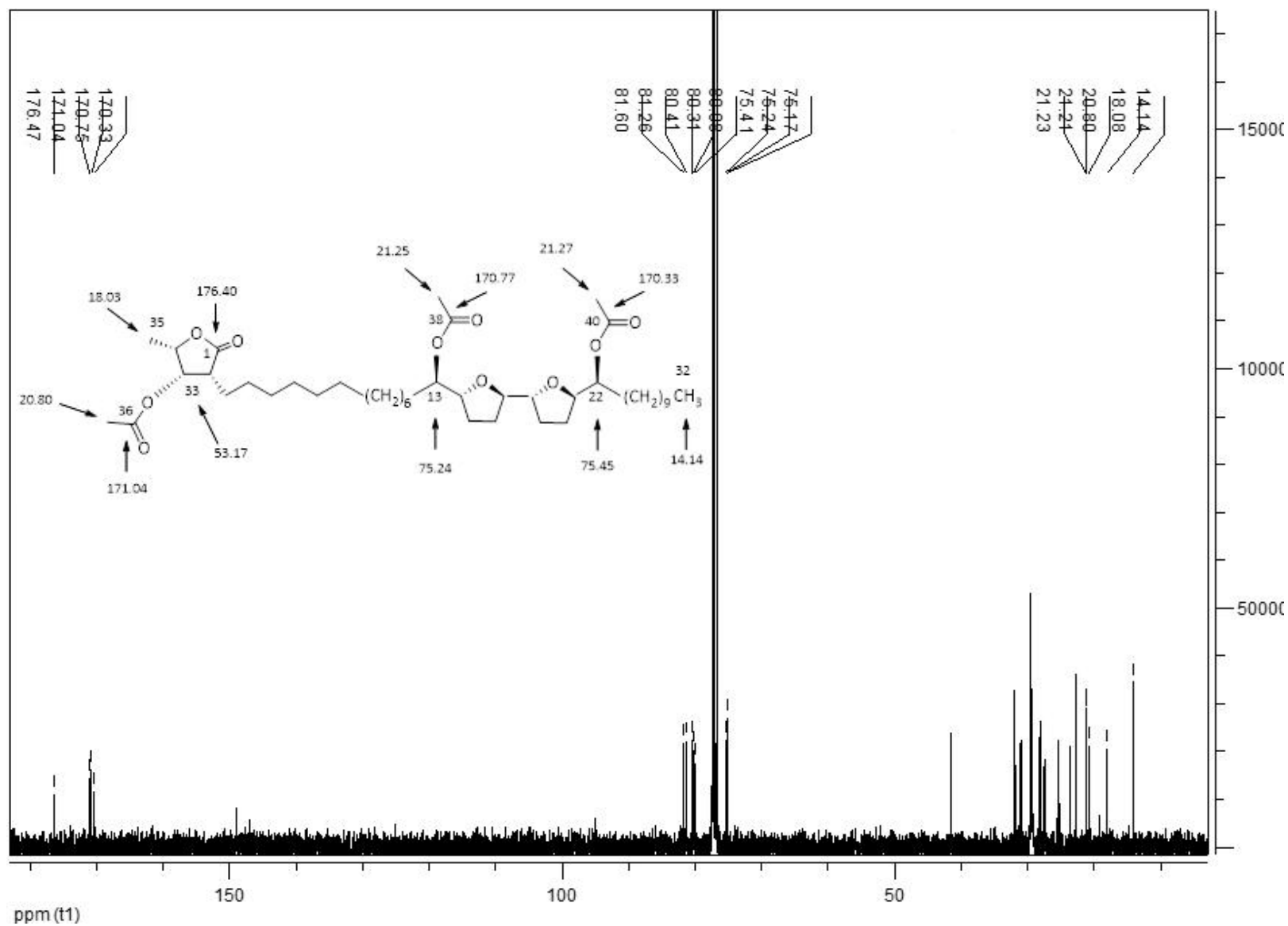




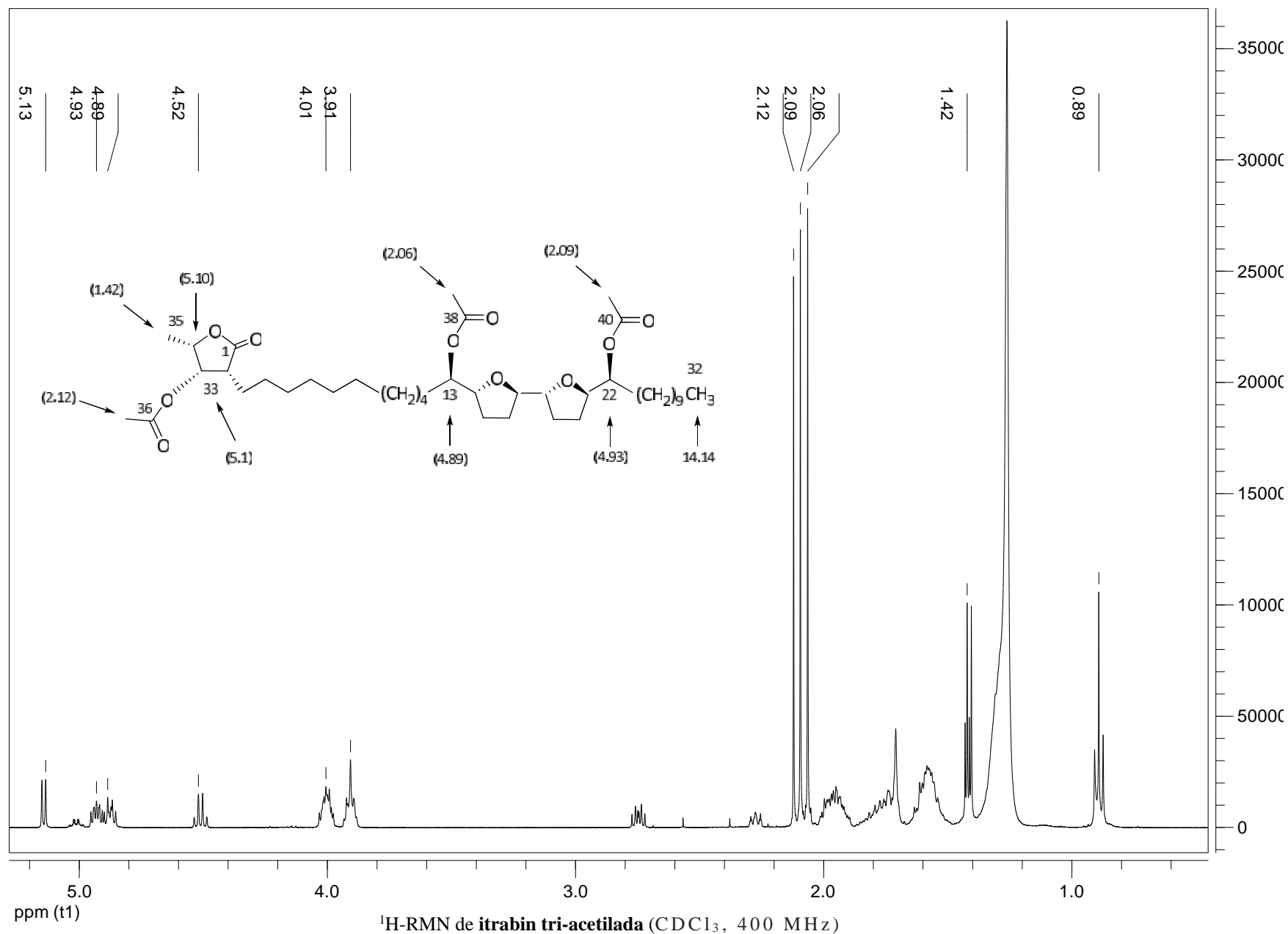


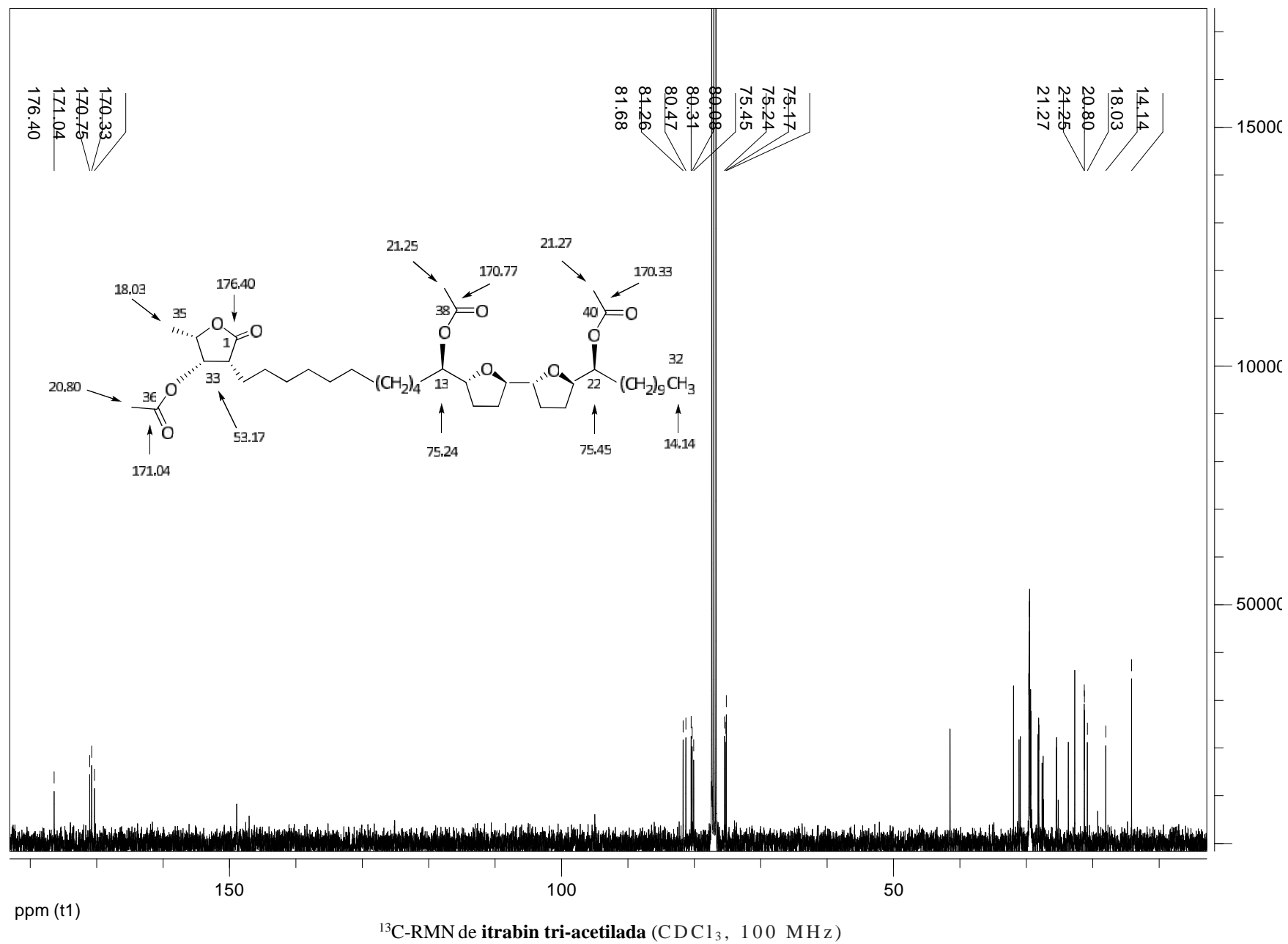


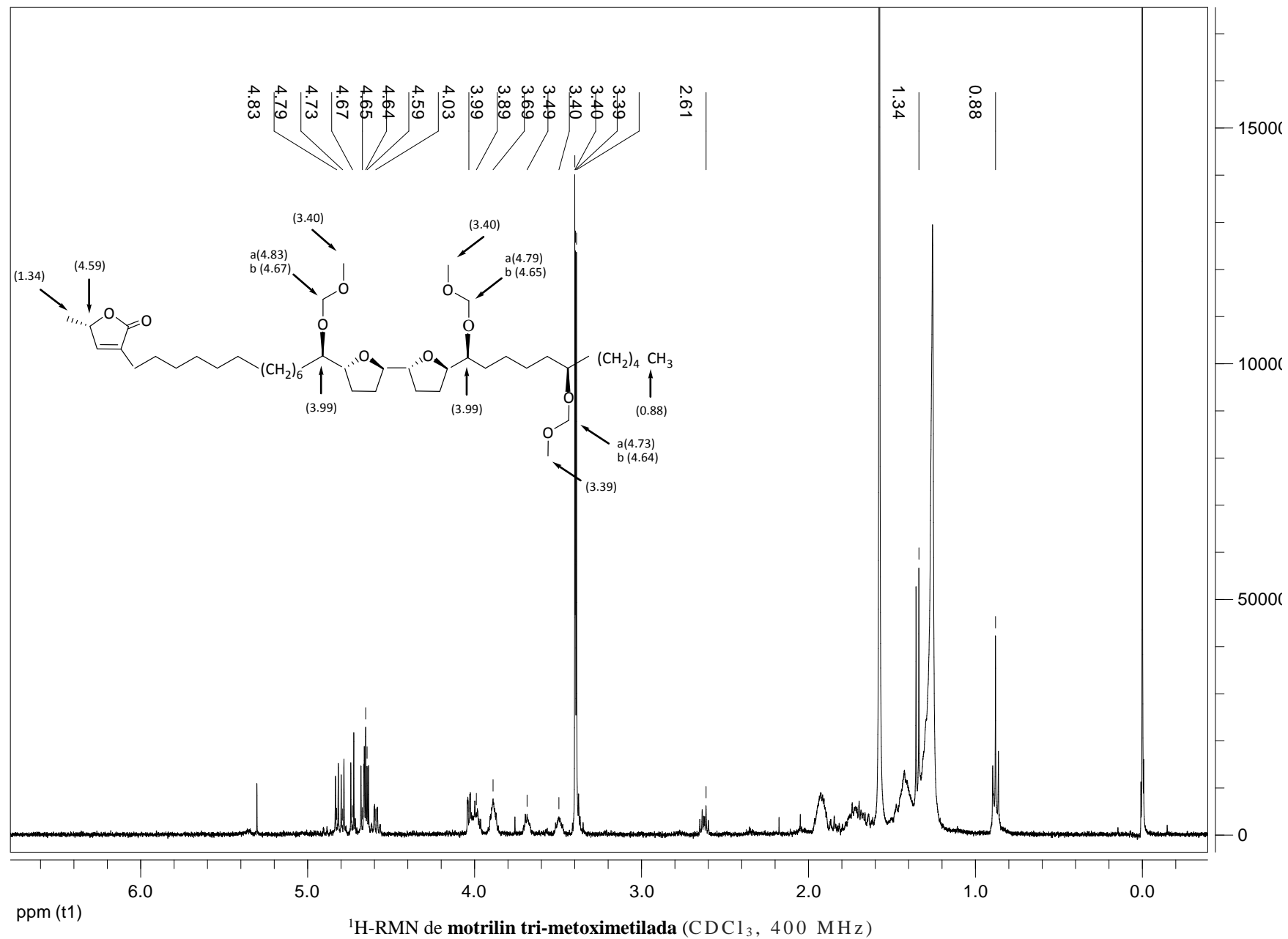
<sup>1</sup>H-RMN de laherradurin tri-acetilada (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

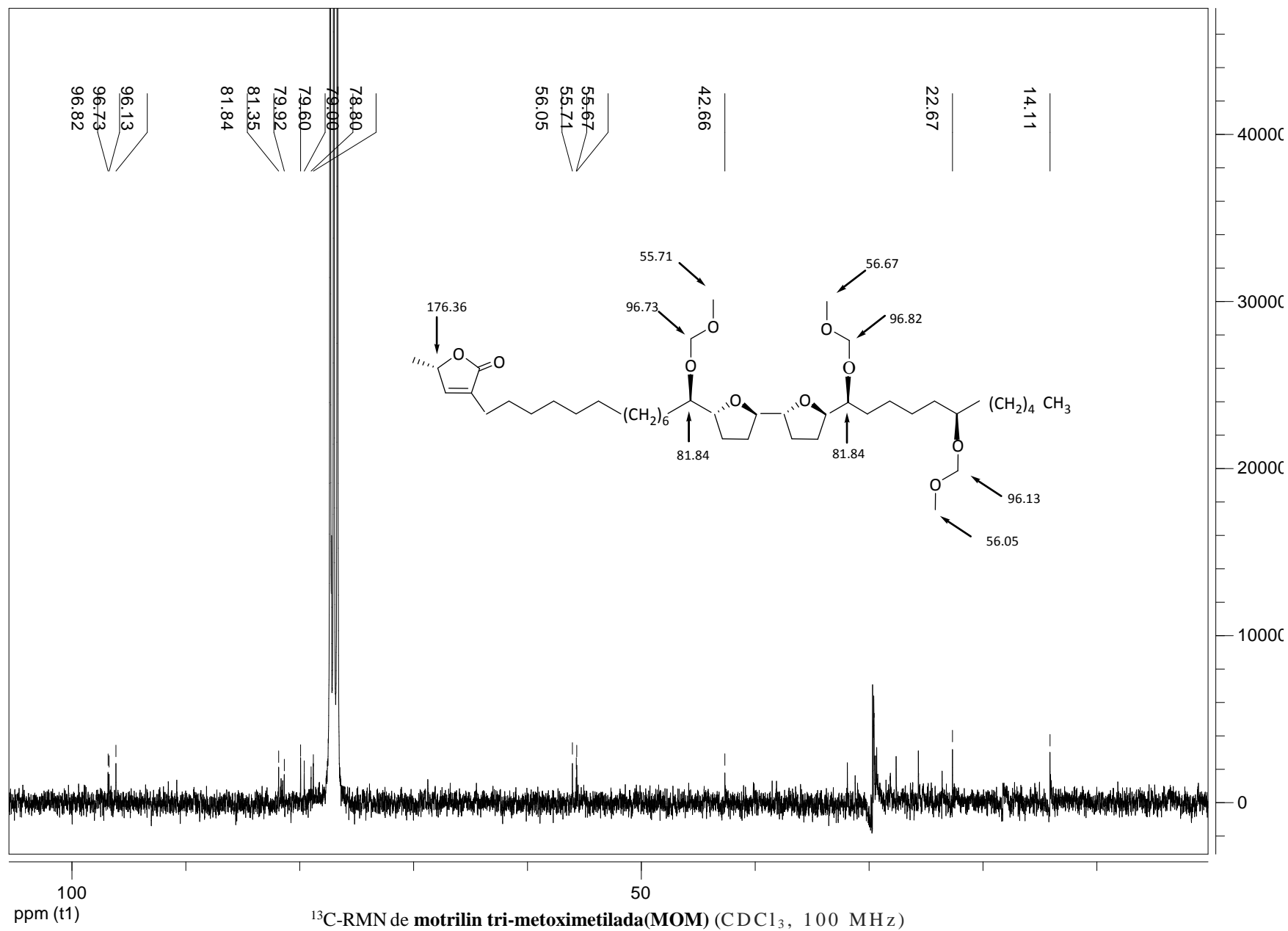


$^{13}\text{C}$ -RMN de laherradurin tri-acetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

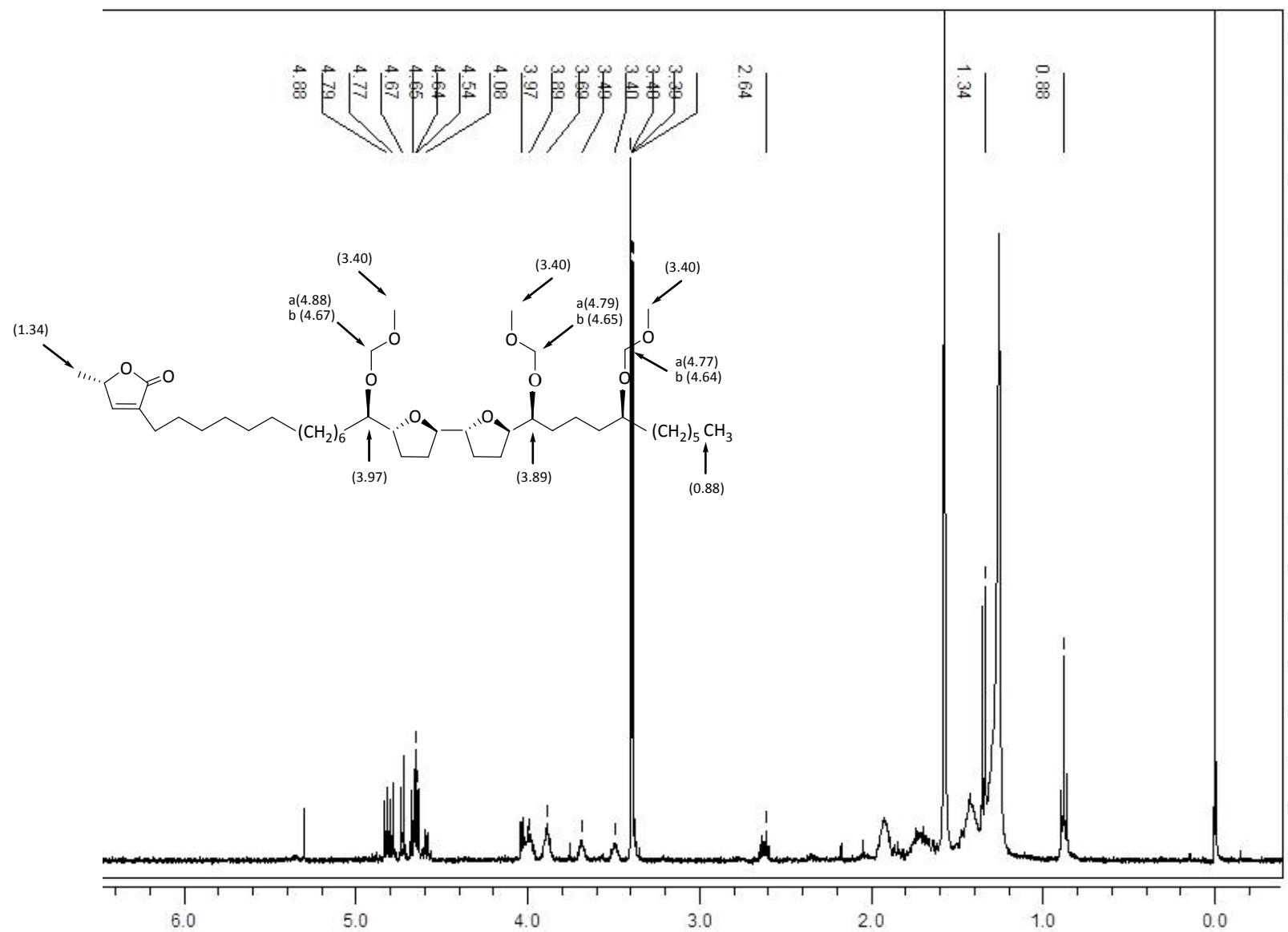




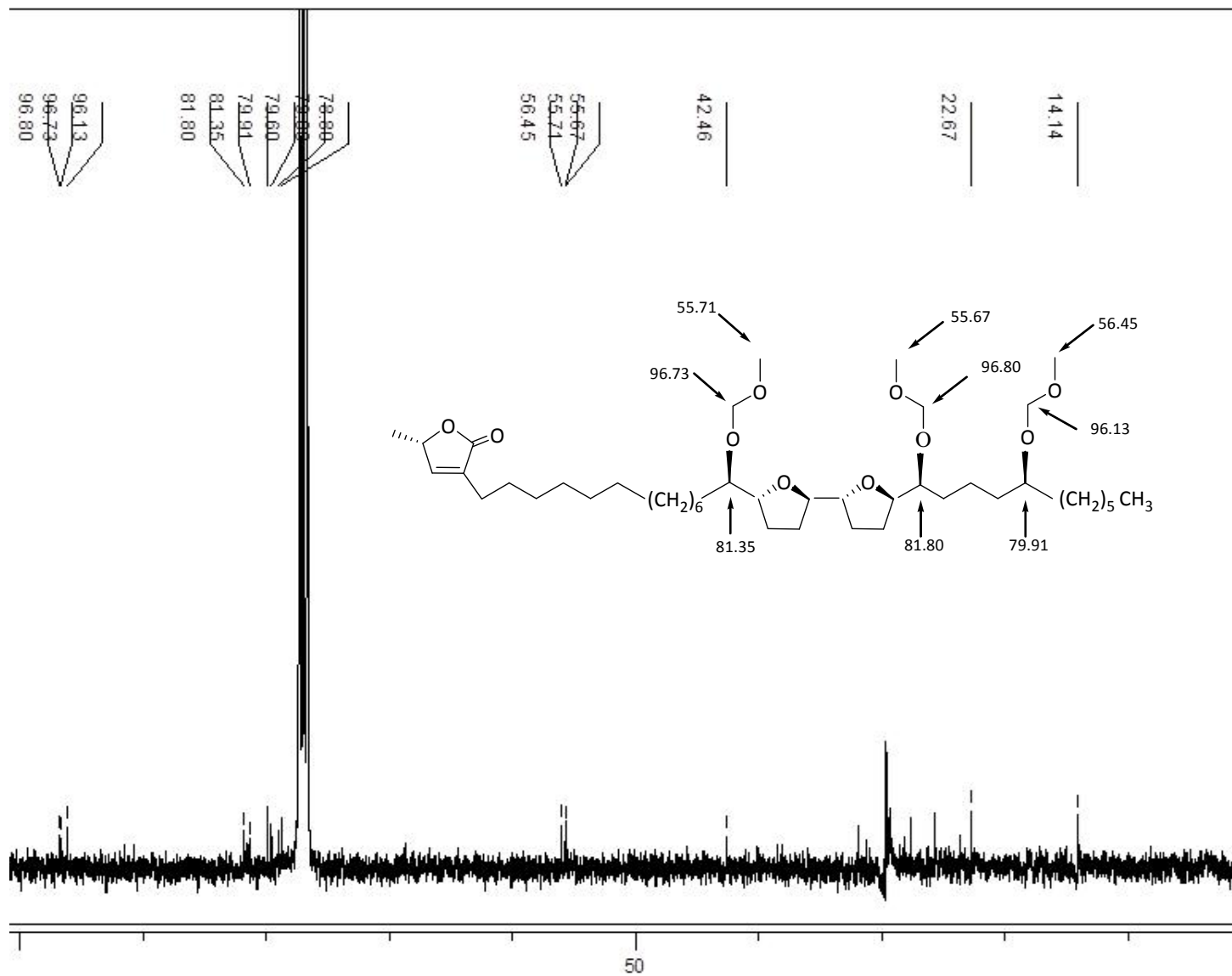






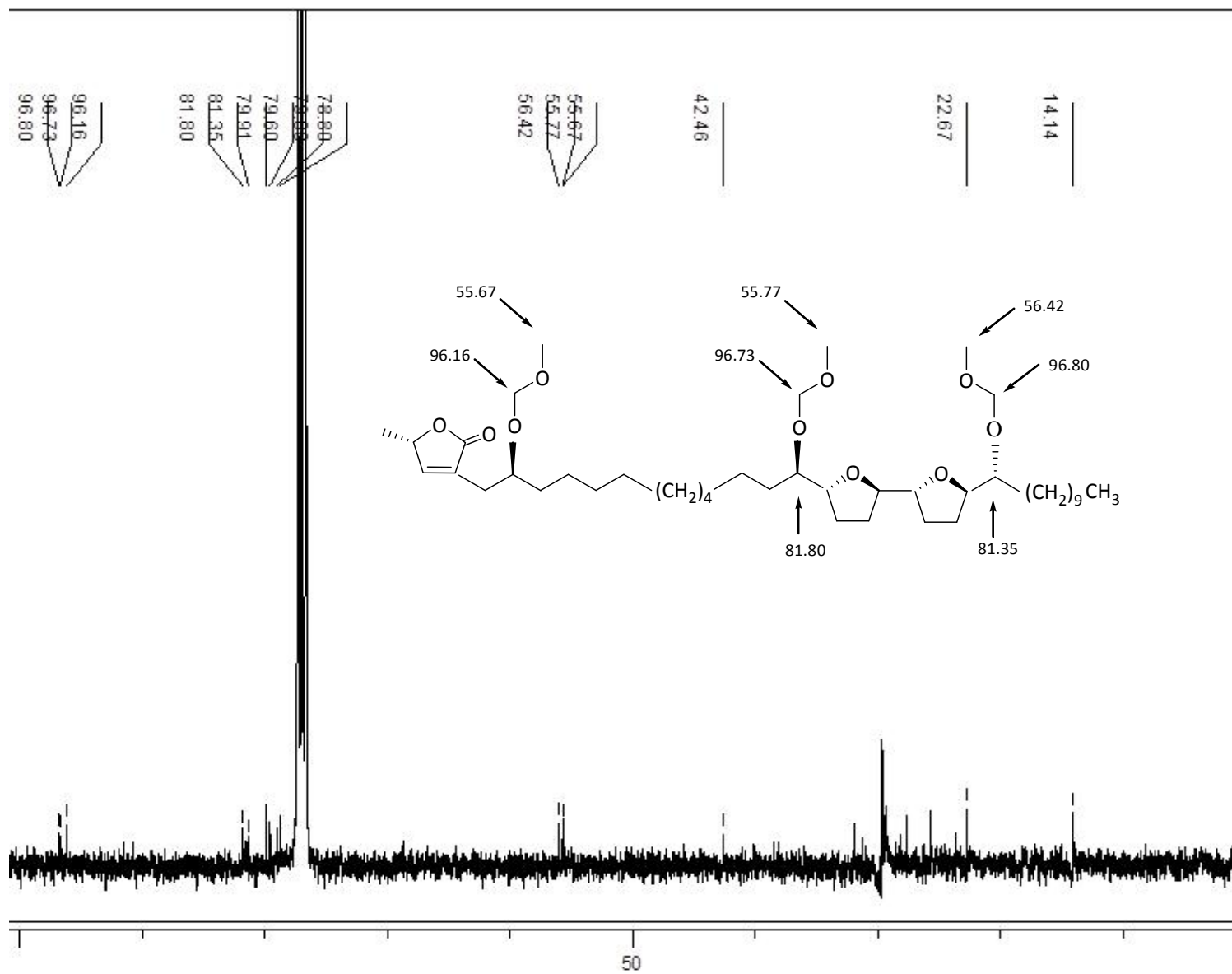


$^1\text{H}$ -RMN de squamocin tri-metoximetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



$^{13}\text{C}$ -RMN de squamocin tri-metoximetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

~ 260 ~



$^{13}\text{C}$ -RMN de rolliniastatin-2 tri-metoximetilada ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

## 9. Producción Científica

### 9.1. Artículos en revistas con referato

- **NATURAL AND DERIVATIZED ACETOGENINS PROMISING FOR THE CONTROL OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SMITH**

José Ruiz Hidalgo, Eduardo Alberto Parellada, Lilian Di Toto Blessing, Alicia Bardón, Keshav Lalit Ameta, Nancy Vera, Adriana Neske. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. **5**, 200-210. (2016).

- **ANNONACEOUS ACETOGENINS WITH INSECTICIDAL EFFECTS ON *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

José Ruiz Hidalgo, Eduardo Alberto Parellada, Alicia Bardón, Kedash Lalul Ameta, Nancy Vera and Adriana Neske. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. **7**, 105-116. (2018).

- **FT-IR AND FT-RAMAN SPECTRA OF ISOLATED SQUAMOCIN AND MOTRILIN ACETOGENINS. ANALYSES AND ASSIGNMENTS OF THEIR MAIN GROUPS**

José Ruiz Hidalgo, Adriana Neske, Maximiliano A. Iramain, Patricia E. Álvarez, Patricio Leyton Bongiorno, Silvia A. Brandán. En etapa de publicación.

### 9.2. Presentaciones a congresos, reuniones y simposios

- **ACETOGENINAS ANNONÁCEAS DE *ANNONA SQUAMOSA* PROCEDENTE DE BRASIL**

José Ruiz Hidalgo, Lilian Di Toto Blessing, Federico Arrighi, Alicia Bardón, Nancy Vera, Adriana Neske. XXX Congreso Argentino de Química (AQA). Buenos Aires – Argentina. 2014.

- **ACETOGENINAS ANNONÁCEAS AISLADAS DE *ANNONA SQUAMOSA* CON ACCIÓN INSECTICIDA SOBRE *SPODOPTERA FRUGIPERDA***

José Ruiz Hidalgo, Solana d'Hiriart, Lilian Di Toto Blessing, Alicia Bardón, Nancy Vera y Adriana Neske. XX Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO). Mar del Plata - Argentina. 2015.

- **REQUERIMIENTOS MOLECULARES DE ACETOGENINAS ANNONÁCEAS CON ACCIÓN INSECTICIDA SOBRE *SPODOPTERA FRUGIPERDA***

- 

José Ruiz Hidalgo, Eduardo Alberto Parellada, Alicia Bardón, Margarita Brovetto, Gustavo Seoane, Nancy Vera y Adriana Neske. XXXI Congreso Argentino de Química (AQA). Buenos Aires – Argentina. 2016.

- **DERIVADOS SINTÉTICOS DE ACETOGENINAS ANNONÁCEAS CON ACCIÓN INSECTICIDA SOBRE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*.**

José Ruiz Hidalgo, Eduardo Parellada, Alicia Bardón, Nancy Vera y Adriana Neske. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO). Potreros de los Funes - Argentina. 2017.

- **EFFECTOS NUTRICIONALES Y TÓXICOS DE ACETOGENINAS ANNONÁCEAS NATURALES Y ACETILADAS SOBRE *SPODOPTERA FRUGIPERDA***

José Ruiz Hidalgo, Eduardo Alberto Parellada, Di Toto Blessing Lilian, Alicia Bardón, Margarita Brovetto, Gustavo Seoane y Adriana Neske. 5° Encuentro Nacional de Química (ENAUQI). Montevideo – Uruguay. 2017.

- **EXTRACTOS DE ANNONÁCEAS CON ACCIÓN INSECTICIDA**

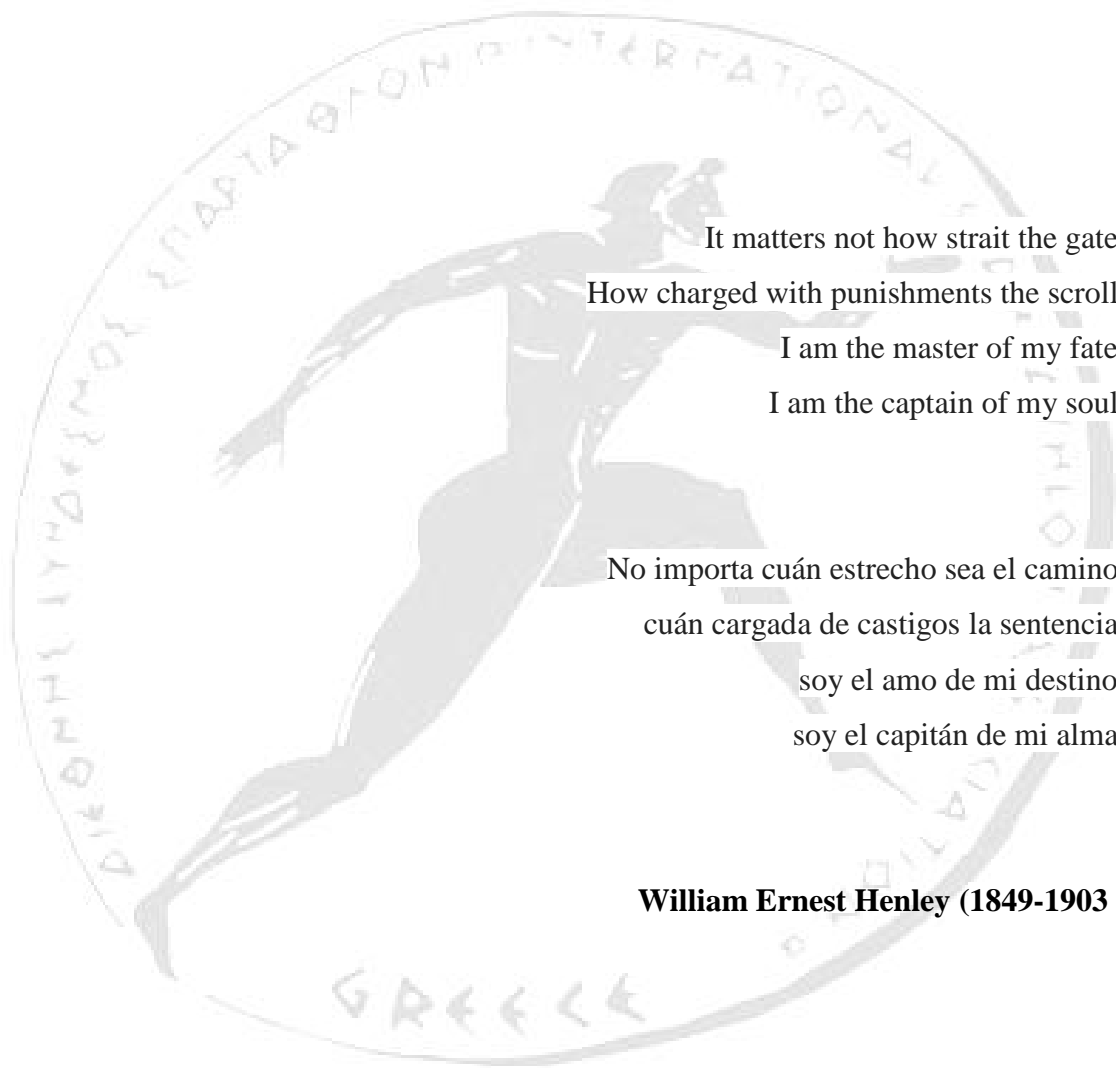
José Ruiz Hidalgo, Alicia Bardón, Nancy Vera y Adriana Neske. Jornadas de Biología (ABT). Tucumán – Argentina. 2017.

- **CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y VIBRACIONAL DE LA ACETOGENINA MOTRILIN AISLADA DE EXTRACTO DE ANNONA CHERIMOLIA**

José Ruiz Hidalgo, Adriana Neske, Maximiliano A. Iramain, Patricia E. Alvarez, Patricio Leyton Bongiorno, Silvia A. Brandán. Enviado a XXI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Tucumán – Argentina. Abril de 2019.

- **ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE LA ACETOGENINA SQUAMOCIN AISLADA DE EXTRACTO DE ANNONA CHERIMOLIA**

José Ruiz Hidalgo, Adriana Neske, Maximiliano A. Iramain, Patricia E. Álvarez, Patricio Leyton Bongiorno, Silvia A. Brandán. Enviado a XXI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Tucumán – Argentina. Abril de 2019.



It matters not how strait the gate,  
How charged with punishments the scroll,  
I am the master of my fate;  
I am the captain of my soul.

No importa cuán estrecho sea el camino,  
cuán cargada de castigos la sentencia,  
soy el amo de mi destino;  
soy el capitán de mi alma.

**William Ernest Henley (1849-1903 )**